

Evaluierung der klinischen und biologischen Relevanz von CEACAM1 Spleißvarianten im malignen Melanom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

M.Sc. Nico Ullrich

aus Ilmenau

Februar 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden in der Klinik für Dermatologie in der Abteilung für Vaskuläre Onkologie und Metastasierung des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Iris Helfrich
2. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp
3. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hölzel

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Bertram Opalka

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	6
2.	Einleitung	9
2.1.	Das maligne Melanom	9
2.1.1.	Klinische Stadieneinteilung	10
2.1.2.	Therapiemöglichkeiten	12
2.1.3.	Bedeutung von Zelladhäsionsmolekülen für die Entstehung und Progression des malignen Melanoms	13
2.2.	Das Carcinoembryonale Antigen verwandte Zelladhäsionsmolekül 1	15
2.2.1.	Die CEACAM Genfamilie	15
2.2.2.	Die Diversität der CEACAM1 Moleküle	16
2.2.3.	Die Relevanz von CEACAM1 für das maligne Melanom	18
2.3.	NK-Zell vermittelte Immunantwort im malignen Melanom	21
2.3.1.	NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität im malignen Melanom	24
2.3.2.	Der Einfluss von CEACAM1 auf die NK-Zell-vermittelte anti-tumorale Immunantwort	25
3.	Ziel der Arbeit	27
4.	Materialien und Methoden	28
4.1.	Materialien	28
4.1.1.	Zellen	28
4.1.2.	Bakterien	29
4.1.3.	Oligonukleotide	30
4.1.4.	Plasmide	31
4.1.5.	Restriktionsenzyme	31
4.1.6.	Polymerasen, Reverse Transkriptasen und Ligasen	31
4.1.7.	Antikörper	32
4.1.8.	Medien, Zusätze und Kit-Systeme	35
4.1.9.	Chemikalien	36
4.1.10.	Verbrauchsmaterialien	38
4.1.11.	Kultivierungsmedien	39
4.1.12.	Verwendete Puffersysteme	40

4.1.13.	Verwendete Gele	42
4.2.	Methoden	43
4.2.1.	Molekularbiologische Methoden	43
4.2.1.1.	Gesamt RNA-Isolation	43
4.2.1.2.	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	44
4.2.1.3.	Reverse Transkription	44
4.2.1.4.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	45
4.2.1.5.	Elektrophorese und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	46
4.2.1.6.	Quantitative PCR (qRT-PCR)	46
4.2.1.7.	Klonierung von DNA Fragmenten in Vektoren	48
4.2.2.	Proteinbiochemische Methoden	50
4.2.2.1.	Proteinisolierung und Western Blot	50
4.2.2.2.	Zymographie	51
4.2.3.	Zellbiologische Methoden	52
4.2.3.1.	Kultivierung von Melanomzellen	52
4.2.3.2.	Transfektion humaner Zellen	53
4.2.3.3.	xCELLigence	53
4.2.3.4.	Soft-Agar Kolonie-Assay	56
4.2.4.	Immunhistochemie (IHC)	56
4.2.4.1.	Standard-Färbeprotokoll	56
4.2.4.2.	CEACAM1 und Phalloidin Co-Färbung	57
4.2.5.	Immunologische Methoden	57
4.2.5.1.	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	57
4.2.5.2.	Isolierung NK-Zellen aus PBMCs	58
4.2.5.3.	CFSE/7-AAD-basierter Zytotoxizitätsassay	58
4.2.5.4.	Durchflusszytometrie	59
4.2.6.	Statistische Auswertung	60
5.	Ergebnisse	61
5.1.	Expressionsmuster der CEACAM1 Isoformen im malignen Melanom	61
5.2.	Etablierung von CEACAM1-Isoform exprimierenden Melanomzelllinien	70
5.3.	CEACAM1 Isoformen weisen unterschiedliche zelluläre Lokalisationen in Melanomzellen auf	72

5.4. Einfluss der CEACAM1 Isoformen auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Melanomzellen	74
5.5. CEACAM1-4L verbessert das matrixunabhängige Wachstum von Melanomzellen	76
5.6. CEACAM1-Isoform spezifische Modulation der Oberflächenexpression von NK-Zell Liganden auf Melanomzellen	78
5.7. CEACAM1-4L erhöht die MMP-vermittelte Freisetzung von löslichen NKG2D Liganden	81
5.8. CEACAM1-3S erhöht die Immunogenität von Melanomzellen durch die Modulation der NKG2D Liganden Expression	83
6. Diskussion	88
6.1. Die CEACAM1-3S Expression korreliert mit dem klinischen Stadium und dem Gesamtüberleben von Melanompatienten	88
6.2. Die zelluläre Lokalisation und funktionelle Eigenschaften von CEACAM1 sind abhängig von der Anzahl an extrazellulären und der Länge der zytoplasmatischen Domänen	91
6.3. CEACAM1 Isoform-spezifische Modulation der Immunogenität von Melanomzellen	95
7. Zusammenfassung	98
8. Summary	100
9. Literaturverzeichnis	102
10. Danksagung	115
11. Abbildungsverzeichnis	117
12. Tabellenverzeichnis	118
13. Publikationen und Kongressbeiträge	119
14. Lebenslauf	121
15. Eidesstattliche Erklärungen	122

1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AJCC	<i>American Joint Commission on Cancer</i>
Ak	Antikörper
ALM	Akrolentiginöses Melanom
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungscluster)
cDNA	zu mRNA komplementäre DANN
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CEACAM	Carcinoembryonales Antigen-verwandte Zelladhäsionsmolekül 1
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CSD	<i>chronic sun damage</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> (zytotoxische T-Lymphozyten)
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (lat.)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
g	Gramm
h	Stunde/n

H ₂ O	Wasser
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LMM	Lentigo-maligne Melanom
m	Milli
M	Molar
mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIC	<i>MHC class I chain-related gene</i>
min	Minute/n
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	<i>messenger-RNA</i> (Boten-RNA)
n	Nano
N	Anzahl
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2 Member D</i>
NKG2DL	<i>Natural Killer Group 2 Member D Ligand</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NM	Noduläre Melanom
p	pico
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration in wässriger Lösung

qRT-PCR	Quantitative, reverse Transkriptase PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde/n
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
t	Zeit
TPBS	Tween/Phosphat-gepufferte physiologische Salzlösung
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
ULBP	<i>UL-16 binding protein</i> (UL-16 bindendes Protein)
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
Δ	Delta
μ	Mikro

2. Einleitung

2.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom, auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet, macht lediglich ca. 10 % aller diagnostizierten Hauttumore aus (79), jedoch sind 79 % aller Hauttumor-assoziierten Todesfälle auf das maligne Melanom zurückzuführen (129). Die Inzidenzrate des Melanoms hat sich in den letzten 20 Jahren verdoppelt (51). Trotz vieler neuer Methoden für die Früherkennung und der Prävention sterben noch immer ca. 20 % aller Melanompatienten an dieser malignen Erkrankung (129). Der gefährlichste Aspekt des malignen Melanoms ist die Fähigkeit der Tumorzellen im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung zu metastasieren (128).

Der Ursprung dieser Erkrankung liegt in der malignen Transformation von pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) in der Haut. Die biologische Funktion von gesunden Melanozyten ist die Produktion des Pigmentes Melanin, welches die Zellen der Haut vor ultravioletter (UV) Strahlung schützt. Hierbei wird durch die UV-Strahlung zunächst das Enzyms Tyrosinase (TYR) aktiviert, welches die Aminosäure Tyrosin durch Hydroxylierung zu Dopachinon umwandelt und das anschließend eigenständig zu Dopachrom oxidiert. In zwei weiteren Schritten wird aus dieser Verbindung durch die Enzyme TYRP1 (*Tyrosinase-related protein 1*) und DCT (Dopachrom-Tautomerase) Melanin synthetisiert.

UV Strahlung besitzt das Potential genetische Veränderungen in den Zellen der Haut hervorzurufen, was zur malignen Entartung dieser führen kann. So konnten bereits verschiedene Treiber-Mutationen im malignen Melanom identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass in ca. 50 % aller kutanen Melanome genetische Aberrationen des BRAF Gens vorhanden sind (79) (Tabelle 1). Bei ca. 80 % dieser BRAF Mutationen handelt es sich um einen Aminosäureaustausch, bei dem das Valin an Position 600 im aktiven Zentrum der Kinase gegen eine Glutaminsäure (BRAF^{V600E}) ersetzt wurde. Weitere wichtige BRAF Mutationen sind V600K (12 %), V600R (5 %) und V600M (4 %) (84). Des Weiteren können in 20 % aller maligner Melanome Mutationen im NRAS Gen detektiert werden (79) (Tabelle 1), wobei es sich vor allem um Aminosäureaustasche an Position 12, 13 und 61 handelt (14). Die häufigsten NRAS Mutationen sind Q61R (35 %) und Q61K (34 %)¹. Neben diesen

¹ Übernommen von www.mycancergenome.org, am 05.02.2015

induzierten Mutationen gibt es noch weitere Ursachen für die Entstehung des malignen Melanoms, zu möglichen Prädisposition zählen dabei vererbte Mutationen im TERT-Promoter (62) oder eine hohe Anzahl an Muttermalen (melanozytärer Nävi), ein supprimiertes Immunsystem sowie verschiedene Viruserkrankungen (36).

Tabelle 1: Häufig auftretende, genetische Veränderungen im malignen Melanom
Übernommen und modifiziert von Gray-Schopfer et. al (51)

Genart	Gen	Häufigkeit / Formen
Onkogen	BRAF	50-70 % mutiert (27)
	NRAS	15-30 % mutiert (27;154)
	AKT3	Überexpression (143)
Tumorsuppressor	CDKN2A	30-70 % deletiert, mutiert oder stillgelegt (133)
	PTEN	5-20 % deletiert oder mutiert (134;154)
	APAF-1	40 % stillgelegt (141)
	p53	10 % deletiert oder mutiert (147)
Andere	Cyclin D1	6-44 % amplifiziert (127)
	MITF	10-16 % amplifiziert (46)
	CEACAM1	70-90 % neo-exprimiert (91;113)

2.1.1. Klinische Stadieneinteilung

Für eine effiziente Überlebensprognose und Therapiestratifizierung ist eine klinische Stadieneinteilung des malignen Melanoms unerlässlich. Die hierzu international anerkannten Kriterien werden vom *American Joint Commission on Cancer* (AJCC) herausgegeben und basieren auf dem TNM-System (3). Im Falle des malignen Melanoms steht das „T“ für die Tumordicke des Primärtumors, welche in vier Kategorien unterschieden wird (T1 bis T4). Ebenfalls wird bei dieser Kategorie berücksichtigt, ob der Tumor ulzeriert ist oder nicht, was mit einem „a“ (ulzeriert) bzw. einem „b“ (nicht ulzeriert) gekennzeichnet wird (Tabelle 2). Bei Melanomen mit einer Tumordicke ≤ 1 mm wird noch ein weiterer essentieller Faktor berücksichtigt, der mitotische Index (118). Der Parameter „N“ berücksichtigt die Anzahl der befallen regionären Lymphknoten. Hierbei gibt es die Abstufung von N0 (keine Lymphknotenmetastasen) bis N3 (≥ 4 Lymphknotenmetastasen). Hierbei geschieht zudem eine Unterscheidung zwischen Mikro- und Makrometastasen, welche durch ein kleines „a“ bzw. „b“ gekennzeichnet werden (Tabelle 2). Der „M“-Faktor beschreibt das Vorhandensein von Fernmetastasen, wobei hier nach der Lokalisation unterschieden wird (Tabelle 2). Zudem

fließt in diese Kategorie die Serumkonzentration der Laktatdehydrogenase (LDH) mit ein, da eine erhöht LDH-Konzentration mit einer schlechteren Prognose korreliert (3).

Basierend auf diesen Kriterien werden Melanompatienten in vier große klinische Stadien unterteilt (Tabelle 2). Bei Patienten des Stadiums I und II sind keine Lymphknoten- oder Organmetastasen vorhanden (Tabelle 2), weshalb diese Patienten durch die Exzision des Primärtumors sehr gut behandelt und ca. 80 % dieser Patienten sogar geheilt werden können (51). Patienten bei denen Lymphknotenmetastasen ohne Organmetastasen vorhanden sind, werden in Stadium III eingeteilt (Tabelle 2). Patienten des Stadium IV weisen sowohl Lymphknoten- als auch Organmetastasen auf und leben unbehandelt ca. 6 Monate (51). Aufgrund der sehr geringen Überlebenschancen von Patienten im Stadium III und IV ist eine frühzeitige Erkennung durch bessere Biomarker und neue Therapiestrategien dringend notwendig.

**Tabelle 2: Klassifizierung von Melanompatienten
entsprechend den AJCC Richtlinien**
Übernommen und modifiziert nach Piris et al., 2011 (118)

	Klinische Stadieneinteilung		
	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I A	T1a	N0	M0
I B	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
II A	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
II B	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0
III	Alle T	N>N0	M0
IV	Alle T	Alle N	M1
Tis, <i>in situ</i> Tumore; T, Primärtumor, N, Lymphknotenmetastasen, M, Organmetastasen			

2.1.2. Therapiemöglichkeiten

In vielen Fällen wird bei der Diagnose des metastasierten Melanoms (Stadium III und IV) noch heute in erster Linie das Chemotherapeutikum Dacarbazin (DTIC) angewendet (41). DTIC weist jedoch in der Monotherapie eine sehr geringe Ansprechrate von 7-12 % auf (20). Dies zeigt, dass es von großer Bedeutung ist neue zielgerichtete Therapien zu entwickeln. Ein besseres Verständnis der biologischen Vorgänge während der Melanomentstehung und –progression sind hierfür jedoch Voraussetzung. Zwei Signalwege sind für die Melanomentstehung und –progression von großer Bedeutung. Hierbei handelt es sich um den Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg (159) und den Phosphoinositid-3-Kinase Signalweg (28).

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg wird in Melanozyten durch Wachstumsfaktoren wie z.B. Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) aktiviert und reguliert das Überleben und die Proliferation dieser Zellen (27). Dieser Signalweg ist in 90 % aller Melanome verstärkt aktiv (51). Dies wird meist durch aktivierende Mutationen im BRAF oder NRAS Gen erreicht (Tabelle 1). Daher stellt dieser Signalweg ein potentes Ziel für zielgerichtete Therapien dar. Im Jahre 2011 stellte die Entwicklung des BRAF^{V600E} Inhibitors Vemurafenib einen großen Durchbruch in der Melanomtherapie dar. Dieser Inhibitor verlängerte nicht nur das progressionsfreie Überleben sondern auch das Gesamtüberleben von Melanompatienten (20). Ein Problem bei der Behandlung des malignen Melanoms ist die Fähigkeit Resistenzen zu entwickeln, so auch gegen Vemurafenib (157). Um dies zu umgehen, gibt es verschiedenste Ansätze durch Kombinationstherapien die Bildung von Rezidiven zu verhindern. Es werden hierbei weitere Inhibitoren eingesetzt, welche die Resistenz-Signalwege blockieren, so z.B. MEK-Inhibitoren (40). Jedoch sind genaue Erkenntnisse über die Resistenzmechanismen der Melanomzellen essentiell, um neue bzw. verbesserte Behandlungsstrategien zu entwickeln.

Im Jahre 2011 wurde die Behandlung des metastasierten Melanoms mit dem monoklonalen Antikörper (mAk) Ipilimumab (41) durch die Europäische Kommission zugelassen. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit diesem humanisierten Antikörper zu einem gesteigerten Gesamtüberleben von Melanompatienten im fortgeschrittenen Stadium führt (58). Dieser mAk ist spezifisch gegen den inhibitorisch-wirkenden CTLA-4 Lymphozytenrezeptor gerichtet. Die Blockade dieses Rezeptors führt zu einer erhöhten Immunaktivität von T-Zellen und somit folglich zur verbesserten Erkennung und Zytolyse von Melanomzellen (41).

Diese Beispiele zeigen deutlich wie sich die klassische Medizin hin zur zielgerichteten, personalisierten Medizin verändert. Jedoch um weiter in diese Richtung fortschreiten zu können, ist es essentiell neue Biomarker zu identifizieren, welche die Therapiestratifizierung verbessern und es ermöglichen neue Therapiemöglichkeiten zielgerichtet einsetzen zu können.

2.1.3. Bedeutung von Zelladhäsionsmolekülen für die Entstehung und Progression des malignen Melanoms

Die Metastasierung von Krebszellen ist ein komplizierter Prozess bei dem maligne Zellen sich von der primären Tumormasse separieren, durch die extrazelluläre Matrix bewegen, in das vaskuläre System eindringen und dort überleben, extravasieren und in einer neuen Umgebung Metastasen bilden (38). Dieser Prozess setzt eine veränderte Adhäsion der Zellen voraus, weshalb die Dysregulation von Adhäsionsmolekülen einen wichtigen Aspekt für die Entstehung und Progression des malignen Melanoms darstellt. Zelladhäsionsmoleküle sind vornehmlich auf der Zelloberfläche exprimiert und binden an gleiche (homophil) oder andere (heterophil) Adhäsionsmoleküle auf benachbarten Zellen. Diese Moleküle vermitteln so die Adhäsion zwischen Zellen vom gleichen Typ (homotypische Adhäsion) bzw. zwischen Zellen aus unterschiedlichen Geweben (heterotypische Adhäsion) (67). Zelladhäsionsmoleküle können in drei Großfamilien eingeteilt werden; Integrine, Cadherine und Immunglobulin Superfamilie.

Bei den Integrinen handelt es sich um heterodimere Oberflächenrezeptoren welche durch die nichtkovalente Bindung der alpha- und beta-Kette eine kationenabhängige Adhäsion vermitteln (67). Es sind bis zu 25 spezifische Integrine bekannt, welche durch die Kombination von 18 verschiedenen alpha- bzw. 8 beta-Ketten generiert werden (77) und sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden (67). So konnte gezeigt werden, dass im malignen Melanom die Expression des Lamininrezeptors $\alpha 6 \beta 1$ (104) und des Vitronectinrezeptors $\alpha v \beta 3$ (26) mit der Prognose und dem klinischen Verlauf von Melanompatienten korrelieren (67).

Maligne Melanozyten erlangen während der Tumorprogression die Fähigkeit sich von der primären Tumormasse zu lösen und der Regulation durch die Keratinozyten zu entziehen, was durch die Dysregulation von E-Cadherinen erreicht wird (67;78). Cadherine vermitteln hauptsächlich eine homophile, Kalzium-abhängige Adhäsion. Im Verlaufe der Melanomprogression kommt es zu einem “ Umschalten “ der Cadherine (*cadherin switch*), hierbei geht die Expression von E-Cadherin verloren und N-Cadherin wird als Äquivalent

exprimiert (78). Die durch N-Cadherin vermittelten Adhäsionen sind weniger affin als jene, die durch E-Cadherine vermittelt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass E-Cadherin für die Regulation der Invasion und Migration von Melanomzellen verantwortlich ist, wohingegen die Expression von N-Cadherin mit der Progression fortgeschrittener Melanome korreliert (78).

Die dritte große Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle bildet die Immunglobuline Superfamilie (Ig-CAM, *Immunoglobulin cell adhesion molecules*). Ig-CAMs besitzen einen charakteristischen Grundaufbau, so kennzeichnet sie eine oder mehrere extrazelluläre Ig-ähnliche Domänen, an welche sich entweder eine Transmembrandomäne oder ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker anschließt (18). Diese Moleküle vermitteln Kation-unabhängige Adhäsionen (67) durch homophile oder heterophile Interaktionen (18). Hierbei können sie mit sich selbst, anderen Molekülen der Ig-Superfamilie oder verschiedenen Proteinen der Zellmembran, wie z.B: Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Integrinen oder Cadherinen (18) in Wechselwirkung treten. Im Melanom wurden verschiedenen Ig-CAMs wichtige Rollen in der Tumorprogression zugeordnet, so auch dem sogenannten *melanoma cell adhesion molecule* (MCAM). MCAM zeigt eine sehr geringe Expression in benignen Nävi, jedoch kann dieses Ig-CAM in 80 % aller Melanommetastasen detektiert werden (67). Die Expression von MCAM korreliert zudem mit dem Metastasierungspotential von Melanomzellen (162). Ein weiteres, im Melanom gut untersuchtes Ig-CAM ist ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) auch als CD54 bekannt. Die ICAM-1 Expression nimmt, ähnlich wie die Expression von MCAM, mit der Progression des malignen Melanoms zu (67). Ein weiteres Zelladhäsionsmolekül, welches zur IgG Superfamilie gehört, ist das Carcinoembryonale Antigen-verwandte Zelladhäsionsmolekül 1 (CEACAM1), dessen klinische und biologische Relevanz im malignen Melanom im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit untersucht wurde.

2.2. Das Carcinoembryonale Antigen verwandte Zelladhäsionsmolekül 1

2.2.1. Die CEACAM Genfamilie

Vor 50 Jahren wurde von Dr. Phil Gold und Dr. Samuel Freedman durch verschiedene immunologische Verfahren erstmals ein Tumorantigen des Kolonkarzinoms beschrieben, welche auch im fötalem Darm exprimiert wird, nicht aber im adultem Dickdarm (Kolon). Da dieses Molekül sowohl in embryonalen als auch in kanzerösen Kolongewebe detektiert werden konnte, wurde es als „*carcinoembryonic antigen*“ (CEA) bezeichnet (48;49). In weiteren Analysen wurde von Thomson et al. gezeigt, dass ebenfalls die Konzentration an löslichen CEA im Kolonkarzinom drastisch erhöht ist (153) und heute noch ist CEA einer der am häufigsten verwendeten Tumormarker weltweit (31). Die weitere Charakterisierung der CEA und CEA-verwandten Proteine mittels spezifischer monoklonaler Antikörper und das Aufkommen neuer Tumor-spezifischer cDNA-Bibliotheken führte zur Entdeckung weiterer CEA-verwandter Moleküle, wie z.B. das NCA (*nonspecific cross-reacting antigen*) und das Biliäre Glykoprotein, später als CEACAM6 bzw. CEACAM1 bezeichnet (6).

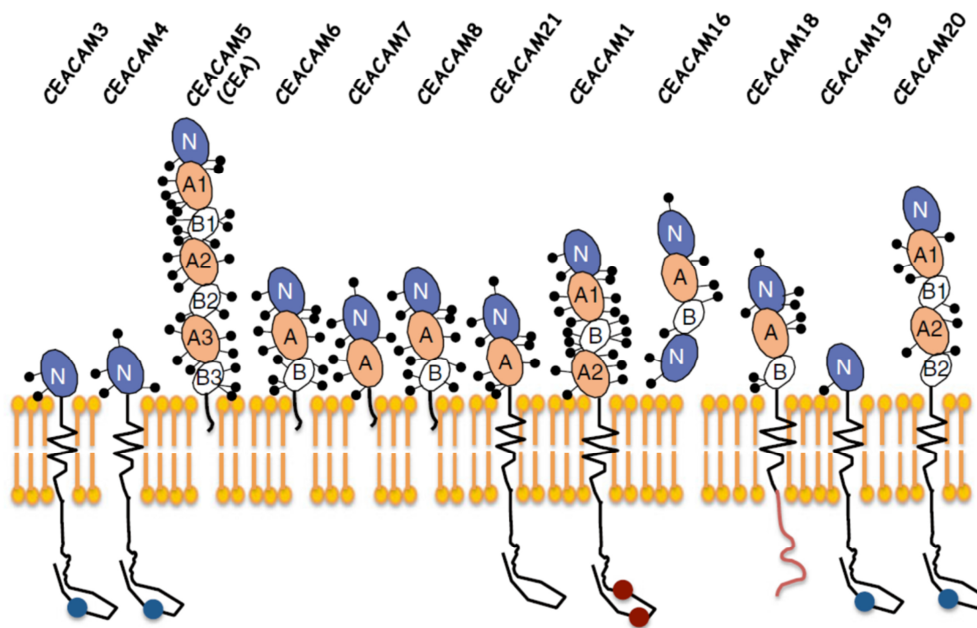


Abbildung 1: Schematische Darstellung der im Menschen exprimierten Mitglieder der CEACAM-Familie

Alle CEACAM Moleküle weisen eine Membran-distale, N-terminale Immunglobulin (Ig) variabel-ähnliche Domäne (blau) auf. Jedoch unterscheiden die einzelnen CEACAMs sich in der Anzahl der Ig konstant-ähnlichen Domänen, bezeichnet als A- (orange) bzw. B- (weiss) Domäne. CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7 und CEACAM8 sind über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden, während die anderen sechs CEACAMs eine Transmembrandomäne besitzen. CEACAM16 ist eine sekretierte Form. Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1 ist gekennzeichnet durch zwei ITIM-Motive (rote Kreise), während CEACAM3, CEACAM4, CEACAM19 und CEACAM20 sogenannte ITAM Motive (blaue Kreise) besitzen. Alle CEACAMs sind an der extrazellulären Seite stark glykosyliert, (dargestellt durch schwarze Punkte). Die Abbildung wurde von Beauchemin et al., 2013 übernommen (6).

Die Identifizierung weiterer CEA-verwandter Moleküle führte zu einer zunehmend komplexer werdenden Nomenklatur, daher wurde 1999 die Nomenklatur dieser Moleküle vereinheitlicht. Seither werden alle diese Moleküle als CEACAMs (*c*arcino*e*m*b*ryonic *a*ntigen-*r*elated *c*ell *a*dhesion *m*olecules) bezeichnet (7). Bis heute wurden 12 unterschiedliche CEACAMs beschrieben (6) (Abbildung 1).

Es handelt sich, soweit bekannt, bei allen CEACAMs um Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie, welche eine gemeinsame Grundstruktur aufweisen. Alle Mitglieder dieser Genfamilie besitzen, mit Ausnahme von CEACAM16, eine N-terminale Ig variabel-ähnliche Domäne und eine variable Anzahl an Ig konstant-ähnlichen Domänen, welche als A- oder B-Domäne bezeichnet werden (Abbildung 1) (6). Diese extrazellulären Domänen sind essentiell für die Funktion als heterophile bzw. homophile, interzelluläre Adhäsionsmoleküle (111) und Pathogenrezeptoren (76). Eine weitere Gemeinsamkeit aller CEACAMs (ausgenommen CEACAM16) ist die membranständige Lokalisation (42), welche entweder durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker oder einer Transmembrandomäne gewährleistet wird. Des Weiteren weisen alle Mitglieder der CEACAM-Familie eine starke Glykosylierung der extrazellulären Domänen auf (6), wobei die Art der Kohlenhydratgruppen hierbei stark zelltypspezifisch sind (10;155).

2.2.2. Die Diversität der CEACAM1 Moleküle

CEACAM1 weist die höchste Gewebsverteilung aller CEACAM-Familienmitglieder auf, hierbei ist es nicht nur in verschiedenen Epithelien (64;65) und Endothelien (72), sondern auch auf unterschiedlichen Leukozyten exprimiert (10;39). Derzeitig sind 12 verschiedene Isoformen dieses Zelladhäsionsmoleküls beschrieben (6) (Abbildung 2), wobei lediglich vier dieser Spleißvarianten experimentell im Menschen, auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnten (5;8). So konnte im humanen System die Expression von CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S experimentell detektiert werden (3). Diese CEACAM1 Varianten unterscheiden sich zum einen in der Anzahl der extrazellulären, Ig-konstant-ähnlichen Domänen und zum anderen in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen (Abbildung 2). Hierbei wird zwischen einer langen (73 Aminosäuren) und kurzen (10 Aminosäuren) zytoplasmatischen Domäne unterschieden. Diese Isoformen kommen durch alternatives Spleißen des Exons 5 (A2 Domäne) und 7 (zytoplasmatische Domäne) zustande. Für die Prozessierung des Exons 7 der CEACAM1 prä-mRNA wurde bereits gezeigt, dass

Stress-induzierte hnRNP Proteine (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) beteiligt sind (29). Bisher ist jedoch nichts über die Spleißmechanismen des Exons 5 bekannt.

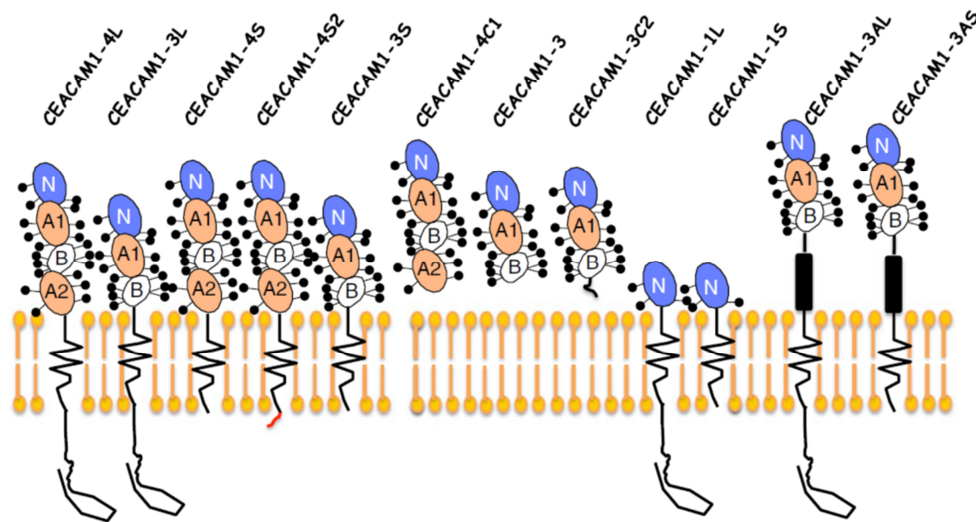


Abbildung 2: Schematische Darstellung aller humanen CEACAM1 Isoformen

Schematische Darstellung der einzelnen Domänen ist äquivalent zu Abbildung 1. Durch differentielles Spleißen werden 12 CEACAM1 Isoformen erzeugt, welche sich in der Anzahl ihrer extrazellulären Domänen so wie der Länge ihrer zyttoplasmatischen Domäne unterscheiden. Entsprechend der standardisierten Nomenklatur von 1999 (7), wird die Anzahl der extrazellulären Domänen nach „CEACAM1“ genannt, der anschließende Buchstabe definiert die Länge der zyttoplasmatischen Domäne (Lang, L (*long*); kurz, S (*short*)). Spezielle Domänen wie Alu-Sequenzen (schwarzes Viereck) werden als A, bzw. ein einzigartiger C-Terminus als C zusätzlich mit im Namen aufgeführt. Abbildung übernommen von Beauchemin et al. (6).

Die beiden intrazellulären Domänen von CEACAM1 sind in den ersten fünf Aminosäuren identisch, jedoch unterscheiden sie sich ab der dort lokalisierten Spleißstelle, welche das Spleißen der zyttoplasmatischen Domäne reguliert (96). In der Morphogenese von Brustdrüsen konnte CEACAM1-4S als wichtiger Faktor für die Lumenbildung identifiziert werden (71). In dieser Studie wurde gezeigt, dass ausschließlich die kurze Variante von CEACAM1-4, nicht aber CEACAM1-4L, Apoptose auslösen kann. Dies verdeutlicht, dass unterschiedliche Signale von diesen Isoformen in das Zellinnere weitergeleitet werden. Ausschließlich die L-Varianten besitzen zwei sogenannte ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*), welche die Übertragung von inhibitorischen Signalen ins Zellinnere vermitteln (29). Diese Motive können durch Src-Kinasen phosphoryliert (pp60c-src) werden was zu einer Rekrutierung weiterer Effektormoleküle führt (13). Außerdem stellt eine Veränderung im Spleißen von CEACAM1 und somit ein verändertes CEACAM1-L zu CEACAM1-S Verhältnis, ein häufiges Ereignis in Brustkrebszellen dar. Hierbei wurde postuliert, dass ein optimales Verhältnis von CEACAM1S- zu -L für die Gewebshomöostase von wichtiger Bedeutung ist (47). Die biologischen Mechanismen und Regulatoren des Exon 5 Spleißens sind bisher genauso unbekannt, wie die biologischen und klinischen Bedeutungen der

unterschiedlichen extrazellulären Domänen. Bisher bekannt ist jedoch, das CEACAM1 über die extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen homophil, mit anderen CEACAM1 Molekülen oder heterophil, mit CEACAM5 (50;160) oder CEACAM8 (138) interagiert. Hierbei kommt der N-terminalen Ig-variabel ähnlichen Domäne (Abbildung 1) eine essentielle Bedeutung zu (160). Diese Domäne vermittelt ebenfalls die Erkennung von CEACAM1 durch Pathogene wie z.B. *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae* (76). Diese humanen Pathogene exprimieren CEACAM1-spezifische Opa (*opacity-associated*) Proteine, welche die Erkennung von CEACAM1 und somit der Zielzellen gewährleisten (50).

2.2.3. Die Relevanz von CEACAM1 für das maligne Melanom

In der Literatur wurde CEACAM1 lange Zeit als Tumorsuppressorgen bezeichnet, da eine Herabregulation dieses Zelladhäsionsmoleküls in den meisten soliden Tumorentitäten nachgewiesen werden konnte, so z.B. in Brustkrebs (65), Darmkrebs (107), Prostatakrebs (85) und Gebärmutterhalskrebs (4). In Melanozyten wird CEACAM1 nicht exprimiert (45;152), jedoch kann in neotransformierten Melanozyten dieses Ig-CAM detektiert werden (45), weshalb man im malignen Melanom von einer CEACAM1 Neoexpression spricht (113). Ein vergleichbares CEACAM1 Expressionsmuster ist für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) bekannt (4;136).

Die Analysen von Gambichler et al., in welchen histopathologisch die CEACAM1 Expression in benignen Nävi (N=42), dysplastischen Nävi (N=22) und dünnen (N=21) sowie dicken (N=21) superfiziell spreitenden Melanomen analysiert wurden, ergaben eine sukzessive Steigerung der CEACAM1 Expression während der dysplastischen Progression von melanozytären Hautläsionen (45). Dies zeigt, dass CEACAM1 scheinbar eine wichtige Rolle in der Progression des malignen Melanoms spielt. CEACAM1 wird in ca. 80% aller malignen Melanome exprimiert (113), weshalb es als potentieller Biomarker für Melanommetastasen in Frage kommt. Aus diesem Grund analysierte Thies et al. mittels des Antikörpers 4D1/C2 das Vorhandensein von CEACAM1 positiven Melanomzellen in Schildwächter-Lymphknotenbiopsien und Organmetastasen und verglich die Ergebnisse mit den Standardmarkern; Melan A, S100 und HMB45 (151). Es zeigte sich, dass die Spezifität und Sensitivität des anti-CEACAM1 Antikörpers, die der bisherigen Standardmarker überstieg. Des Weiteren zeigte sich, dass CEACAM1 scheinbar an einer lymphatischen und

hämatogenen Metastasierung beteiligt ist (151), was CEACAM1 zu einem potentiellen Ziel für anti-metastatische Immunotherapien macht.

Der Einfluss von CEACAM1 auf die Zellproliferation wird kontrovers diskutiert (32;112). So wurde von Müller et. al. gezeigt, dass die CEACAM1 Expression keinen Einfluss auf die Proliferation von RBE (*rat brain endothelial*) Zellen hat (101), jedoch die Proliferationsrate von Prostatakrebszellen erhöht (16). In Melanomzellen konnte kürzlich von Ortenberg et al. gezeigt werden, dass die CEACAM1-L Expression in manchen Melanomzelllinien die Proliferation via Sox-2 erhöht. Jedoch zeigen diese Analysen ebenfalls, dass es auch Zelllinien gibt, die nach CEACAM1 Herabregulation keine veränderte Proliferation aufweisen. (112). Thies et al. zeigten, dass die Expression von Gesamt-CEACAM1 in primären Melanomen (Stadium I/II) mit einer signifikant geringeren krankheitsfreien Überlebensrate und einem erhöhten Metastasierungsrisiko korreliert (152). In dieser Studie wurden 100 primäre, kutane Melanome immunhistochemisch auf ihre CEACAM1 Expression untersucht. Hierbei zeigte sich, dass innerhalb von 10 Jahren 70 % der Patienten mit CEACAM1 positiven Primärtumoren, jedoch lediglich 10 % der Patienten mit CEACAM1 negativen Primärtumoren Metastasen entwickelten (152). Bei diesen Analysen zeigte sich die stärkste CEACAM1 Expression an der Invasionsfront. Multivariate Analyse ergaben, dass CEACAM1 im malignen Melanom einen unabhängigen, prognostischen Marker für die Entwicklung von Metastasen darstellt. Der CEACAM1 Expressionsstatus ist unabhängig von klassischen Indikatoren (siehe 2.1.1), wie z.B. der Tumordicke, Ulzeration und der mitotischen Rate (152). Des Weiteren zeigten Untersuchungen von verschiedenen, CEACAM1 exprimierenden und nicht-exprimierenden Melanomzelllinien, welche subkutan in immunsupprimierte Mäuse injiziert wurden, dass die Expression von CEACAM1 mit einem gesteigerten Tumorwachstum und einer erhöhten Metastasierungsrate korrelierte (151). In diesem Kontext konnte die Gruppe um Jens Brümmer mittels *in vitro* Experimenten zeigen, dass die Expression von CEACAM1-4L deutlich das Invasions- und Migrationspotential von Melanozyten und Melanomzellen erhöht (32). In der langen zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1-L sind zwei phosphorylierbare Tyrosinreste, das Tyr488 und das Tyr516 lokalisiert, welche zwei ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) Motive bilden (111). Interessanterweise postuliert die Gruppe um Dr. Brümmer, dass für die invasionsfördernde Funktion von CEACAM1 lediglich das Tyr488 eine essentielle Rolle spielt (32). In Abhängigkeit von der Phosphorylierung des Tyr488 kann CEACAM1 mit β_3 -Integrinen interagieren, was den Effekt von CEACAM1-L auf die Melanomzellmotilität zumindest in Teilen erklärt (12;32). So konnte die CEACAM1-vermittelte Invasion und

Migration von Melanomzellen mittels RGD-Peptide, welche die Integrin-Signalwege inhibieren, reduziert werden (12;32).

In einer weiteren Studie aus dem Jahre 2009 zeigte sich, dass im Serum von Melanompatienten erhöhte Konzentrationen an löslichen CEACAM1 Molekülen detektiert werden können (91). Hierbei wurden die Konzentrationen von löslichen CEACAM1 im Serum von gesunden Spendern und von Patienten mit und ohne Anzeichen einer aktiven Melanomerkrankung (siehe 2.1.1) verglichen. Patienten ohne Anzeichen einer Erkrankung erhielten zuvor eine Therapie, welche zu einer kompletten Regression der Tumore führte. Es zeigte sich, dass ausschließlich Patienten mit Anzeichen einer Erkrankung (Stadium I bis IV) signifikant mehr lösliches CEACAM1 im Serum aufwiesen (91). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Konzentration an löslichen CEACAM1 im Serum von Melanompatienten invers mit deren Gesamtüberleben korrelierte. (91). *In vitro* konnte eine Korrelation zwischen der Konzentration des löslichen CEACAM1 und der Anzahl an CEACAM1 positiven Melanomzellen nachgewiesen werden. Hierbei ist die Freisetzung des CEACAM1 abhängig von einer aktiven Proteinsynthese und Sekretion, wobei die proteolytische Abspaltung von Oberflächen-CEACAM1 keine Rolle spielt (91). Diese Studie zeigte außerdem, dass signifikant mehr natürliche Killerzellen (NK) und T-Zellen in Melanompatienten, verglichen mit gesunden Spendern, CEACAM1 exprimieren und dass diese Expression von CEACAM1 mit einem abnormen Phänotyp der NK-Zellen einhergeht. So ergab sich eine negative Korrelation zwischen der CEACAM1 Expression in NK-Zellen und der Oberflächenexpression der NK-Zellrezeptoren CD16, NKp30, NKp46 (91). Diese phänotypisch veränderten NK Zellen wiesen weiterhin eine geringere Sensitivität gegenüber CEACAM1 exprimierenden Melanomzellen auf, verglichen mit NK Zellen isoliert aus dem Blut gesunder Spender (91). Dies zeigt erneut, dass CEACAM1 eine wichtige Rolle für die Immunogenität des malignen Melanoms spielt und dass lösliches CEACAM1 eventuell als neuer prognostischer Marker für die Melanomerkrankung fungieren könnte.

Wie bereits angedeutet, vermittelt CEACAM1 in Melanomzellen einen direkten und indirekten Schutz vor der NK-, T-, NKT- und B-Zell-vermittelten, anti-tumoralen Immunantwort (10;50;63;103). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Fokus auf den Einfluss von CEACAM1 auf die NK-Zell-vermittelte anti-tumorale Immunantwort gelegt.

2.3. NK-Zell vermittelte Immunantwort im malignen Melanom

Das maligne Melanom ist ein hoch immunogener Tumor. Diese Beschreibung basiert auf der Tatsache, dass manifestierte, maligne Melanome durch die Infiltration von Lymphozyten in spontane Remission gehen können (15;68;120;121). Zu diesen infiltrierenden Immunzellen gehören unter anderem die NK-Zellen, welche Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind. Diese Zellen sind in der Lage Tumorzellen, ohne eine vorausgehende Sensibilisierung zu erkennen und zu lysieren (19). Bei etwa 15 % aller Blutlymphozyten handelt es sich um NK-Zellen, welche als CD56 / CD16 positive und CD3 negative Zellpopulation definiert sind (19). Die Fähigkeit von NK-Zellen spezifisch neotransformierte Zellen zu erkennen wird bereits therapeutisch bei der Interleukin-2 (IL-2) - basierten Behandlung des Melanoms ausgenutzt. Hierbei werden Melanompatienten mit einer hohen Dosis an IL-2 behandelt, was zu einer Aktivierung der T- und NK-Zellen und somit zu einer anti-tumoralen Immunantwort führt (19). Die Aktivierung der NK-Zellen ist ein komplexer Prozess, welcher die Interaktion von NK-Zellrezeptoren und deren Liganden miteinschließt. Diese Rezeptoren können sowohl aktivierend als auch inaktivierend wirken (Tabelle 3). Hierbei ist ein spezifisches Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen von großer Bedeutung. Führt z.B. die Transformation von Zellen zu einer Verschiebung hin zu mehr aktivierenden Liganden auf der Oberfläche, so resultiert dies in einer NK-Zell-vermittelten Lyse dieser Zellen. Nach ihrer Aktivierung können sie durch die Sekretion von Interferon (IFN)- γ und Tumornekrosesfaktor (TNF)- α immunmodulatorische Effekte hervorrufen oder direkt die Zielzellen, durch die Freisetzung von Perforinen und Granzymen lysieren (98). Des Weiteren führt die Interaktion zwischen NK- und dendritischen Zellen (DC) zu einer Aktivierung der NK-Zellen und zu einer Reifung der DCs (161). Durch die Reifung der DCs beginnen diese inflammatorische Zytokine freizusetzen und stimulieren die T-Zellantwort (98).

Die Oberflächenkonzentrationen von MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I Molekülen spielt eine wichtige Rolle für die Sensitivität bzw. Resistenz der Zielzellen gegenüber der NK-Zell-vermittelten Immunantwort. Zielzellen mit geringen MHC Klasse I Konzentrationen bzw. Zellen, die ein oder mehrere MHC Klasse I Allele verloren haben, senden ein inhibierendes Signal an NK-Zellen und können gezielt von NK-Zellen lysiert werden (Abbildung 3 B) (98). Eine verringerte Expression von MHC Klasse I Molekülen kann auch durch eine virale Infektion oder durch die Transformation zu Tumorzellen hervorgerufen werden, was diese Zellen somit zu potentiellen Zielzellen für NK-Zellen macht

(98). NK-Zellen sind somit befähigt zwischen gesunden und infizierten bzw. tumorösen Zellen zu unterscheiden.

Neben inaktivierenden Rezeptoren exprimieren NK-Zellen auch zahlreiche stimulierende Rezeptoren (Abbildung 3 B und C, Tabelle 3). Die Expression der Liganden für diese Rezeptoren werden durch zellularen Stress, wie z.B. maligne Transformation induziert bzw. erhöht.

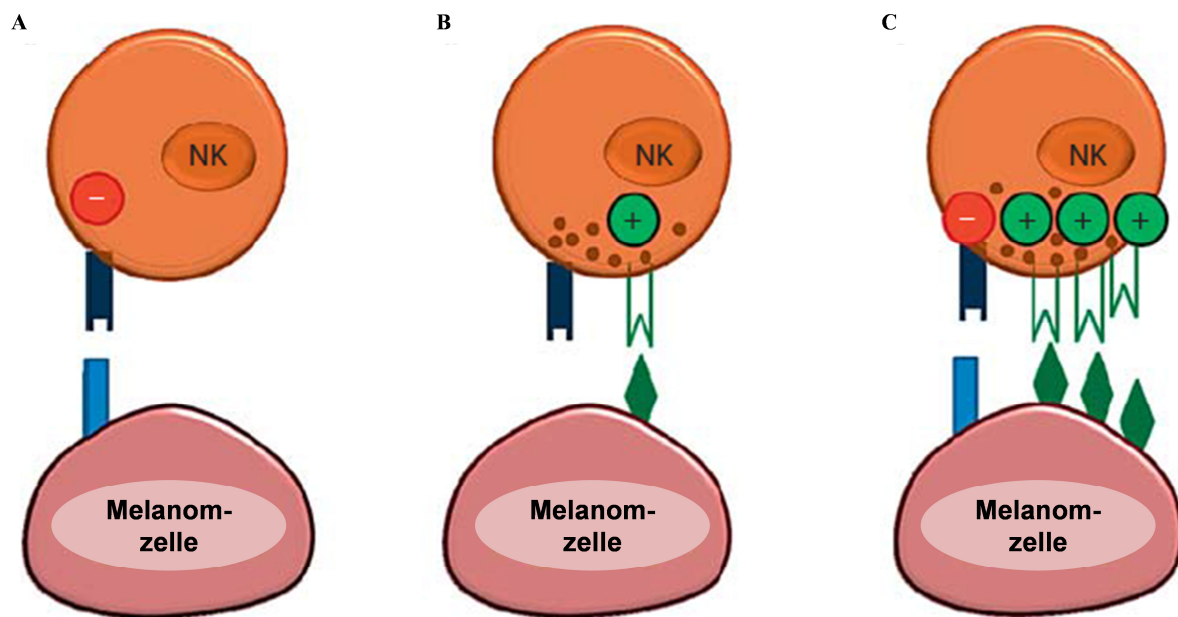


Abbildung 3: NK-Zell Aktivierung ist abhängig von der Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen
(A) MHC Klasse I Moleküle (hellblauer Balken) auf der Oberfläche von Melanomzellen interagiert mit dem inhibierenden MHC Klasse I Rezeptor (dunkelblauer Balken) exprimiert auf NK-Zellen und verhindert so die Lyse der Tumorzelle. (B) In Abwesenheit von inhibitorischen Signalen sensitiviert die Expression von Liganden (grüne Raute) für aktivierende Rezeptoren (grüne Linie) die Melanomzellen gegenüber der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität. (C) Die Zytolyse von Melanomzellen welche MHC Klasse I und aktivierenden Liganden exprimieren hängt von der Balance zwischen der Aktivierung von inhibitorischen und stimulierenden Rezeptoren ab. (modifiziert nach Morgado et al., 2011 (98))

Die Balance der Signale ausgehend von inhibierenden Rezeptoren und stimulierenden Rezeptoren, nach Interaktion mit ihren Liganden, reguliert maßgeblich die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen. Durch die Möglichkeit die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen zu manipulieren und somit die Sensibilität von Tumorzellen gegenüber NK-Zell-vermittelter Zytolyse zu erhöhen, führte zu neuen klinischen Therapieansätzen (98;150).

Tabelle 3: NK-Zellrezeptoren

Verwendete Abkürzungen: HLA; Humanes Leukozyten Antigen, KIR, *killer Immunoglobulin-like receptor*, IFN, Interferon, Übernommen und modifiziert von Pegram et al. (115) und Srivastava (142).

Aktivierende Rezeptoren	Ligand
CD11b	CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2)
CD16	IgG
CD28	B7-1, B7-2
CD44	Hyaluronsäure
CD69	-
CD244	CD48
IFN- α β R	IFN- α , IFN- β
NKG2C, NKG2E	HLA-E
NKG2D	ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, ULBP6, MICA, MICB
NKp30, NKp90	Tumorliganden, unbekannt
NKp44	Tumorliganden, unbekannt
NKp46	Hemagglutinin; Tumorliganden, unbekannt
NKp80	activation-induced C-type lectin (AICL)
ILT2	Verschiedene HLA Moleküle
Verschiedene KIRs	HLA-A/-B/-C
DNAM-1	PVR, CD122
Inhibierende Rezeptoren	Ligand
KIR2DL	HLA-C
KIR3DLI	HLA-B
KIR3DL2	HLA-A
CD94/NKG2A	HLA-E
ILT2	Verschiedene HLA Moleküle
P49/KIR2DL4	HLA-G
NKR-P1A	LLT-1
LILR	MHC Klasse I

2.3.1. NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität im malignen Melanom

Das NKG2D (*Natural Killer Group 2 Member D*) Rezeptor/ Liganden System spielt bei der Erkennung von Melanomzellen eine essentielle Rolle. Der NKG2D Rezeptor wird auf NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, NKT-Zellen und einer kleinen Untergruppe von CD4⁺ T-Zellen exprimiert (19;120;121). Dieser Rezeptor erkennt MIC (*MHC class I chain-related gene*) (MICA/B) sowie ULBP (*UL-16 binding proteins*) (ULBP1-6) Moleküle (98;115;142). Im Melanom wird MICA mit einer höheren Frequenz exprimiert, als MICB (116;156). Weiterhin weist ULBP2 im malignen Melanom die höchste Abundanz aller ULBP Moleküle auf, wobei ULBPs weniger stark exprimiert werden als MICA Moleküle (156).

Der NKG2D Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der Erkennung von NKG2D Liganden (NKG2DL) exprimierenden Zellen, was bereits durch Blockierungsexperimente gezeigt werden konnte. Jedoch können sich Melanomzellen einer NKG2D-vermittelten Erkennung durch eine Verringerung NKG2DL Oberflächenexpression entziehen. Diese Modulation kann beispielsweise durch die Anwesenheit von Zytokinen wie z.B. IFN- γ und IL-10 (98), oder die Retention der Liganden in Endosomen, Lysosomen, dem Golgi Apparat und Endoplasmatischen Retikulum (44) erreicht werden. Von Heinemann et al. wurde weiterhin gezeigt, dass auch microRNAs die Expression von NKG2DL regulieren (57). Ebenfalls gezeigt wurde, dass eine CEACAM1 Expression zu einer Retention der NKG2DL führt (21). Die Freisetzung der NKG2DL spielt hierbei eine duale Rolle, zum einen wird so die Oberflächendichte dieser Moleküle verringert und zum anderen führt die Bindung der löslichen NKG2DL an den NKG2D Rezeptor auf NK-Zellen zu einer verringerten NKG2D Expression, was eine reduzierte zytotoxische Aktivität dieser Immunzellen zu Folge hat (105). Diese Freisetzung kann durch das alternative Spleißen von NKG2DL RNA Transkripten erreicht werden, wodurch Moleküle ohne Transmembrandomäne generiert werden (2). Weiterhin können diese Liganden auch über Exosomen freigesetzt werden (37). Der bisher am besten analysierte Mechanismus um NKG2DL freizusetzen ist jedoch die proteolytische Abspaltung von membranständigen Liganden durch die Aktivität von Metalloproteasen und Disintegrinen (52;82).

Weitere aktivierende NK-Zellrezeptoren, welche eine Rolle bei der Erkennung von Melanomzellen spielen, sind die NCRs (*Natural cytotoxicity receptors*) (80). Für drei dieser Rezeptoren, NKp30, NKp44 und NKp46 konnte eine Rolle für die Melanomzellerkennung nachgewiesen werden (98). Bisher wurden lediglich zwei Liganden dieser Rezeptoren identifiziert, hierbei handelt es sich um Heparansulfat (55) und B7-H6 (11). Hierbei nimmt

NKp46 eine zentrale Rolle bei der NCR-vermittelten Erkennung von Tumorzellen ein (117;140).

Der dritte bedeutende NK-Zellrezeptor für die Melanomzellerkennung ist DNAM-1 (*DNAX accessory molecule-1*), dieser Rezeptor wird auf NK-Zellen, T-Zellen, Monozyten und B Zellen exprimiert (98). Die Liganden, CD155 und CD112 werden auf verschiedenen Tumorzellen exprimiert, so auch auf Melanomzellen (17). CD155 zeigt in Melanomzellen die höheren Expressionslevel, verglichen zu CD112 (98). Für die DNAM-1 vermittelte Zytolyse von Melanomzellen ist meist eine Interaktion mit NCRs notwendig (98). DNAM-1 spielt vor allem für die Erkennung von NKG2DL negativen Melanomzellen eine wichtige Rolle (98).

2.3.2. Der Einfluss von CEACAM1 auf die NK-Zell-vermittelte anti-tumorale Immunantwort

CEACAM1 kann direkt, über trans-Interaktion mit anderen CEACAM1 Molekülen oder indirekt durch Modulation von NK-Zell Rezeptor / Liganden Expression die NK-Zell-vermittelte Immunantwort beeinflussen.

CEACAM1 ist, wie bereits beschrieben, in ca. 80 % aller Melanome exprimiert (113) und wird ebenfalls von NK-Zellen exprimiert (21;50;63). Jedoch wird CEACAM1 nicht auf allen NK-Zellen gefunden, so wird die CEACAM1 Expression nur nach Stimulation in CD16⁻ CD56⁺ NK-Zellen induziert, jedoch nicht in CD16⁺ CD56⁺ Zellen (50;69;86). Hierbei muss erwähnt werden, dass CD16⁻ CD56⁺ NK-Zellen eine höhere Abundanz und eine höhere zytolytische Aktivität aufweisen als CD16⁺ CD56⁺ Zellen. Die trans-Interaktion zwischen Melanom-CEACAM1 und NK-Zell-CEACAM1 führt zu einer MHC Klasse I unabhängigen Suppression der zytotoxischen NK-Zellen Aktivität (88;92). Hierfür konnte gezeigt werden, dass die Aminosäurereste Arginin und Glutamin an Position 43 bzw. 44 essentiell für diese Interaktion ist (87). Durch die Aktivierung von NK-Zellen mit IL-2 kommt es zu einer verstärkten Expression von CEACAM1 auf der Oberfläche und zu einer Interaktion von CEACAM1 und NKG2D, die Aktivierung von CEACAM1, durch die Interaktion mit CEA bzw. CEACAM1 Molekülen auf den Zielzellen, führt zur Rekrutierung und Aktivierung der Src- homologen Phosphatase 1 (SHP-1), welche das GEF (*guanine exchange factor*) Vav1 dephosphoryliert. Das dadurch inhibierte Vav1 führt zu einer Unterdrückung der NKG2D vermittelten Signalkaskade und verhindert somit die Initiation der Zytolyse (63). Erhöhte Oberflächenexpression von CEACAM1 auf Tumorzellen stellt daher einen MHC Klasse I unabhängigen Mechanismus dar, der anti-tumoralen Immunantwort zu entgehen. Jedoch kann

die CEACAM1 Expression auf NK-Zellen nicht nur durch IL-2 verstärkt werden, es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Ko-Kultivierung von NK-Zellen und CEACAM1 positiven Tumorzellen zu einer Erhöhung der CEACAM1 Expression auf NK-Zellen führt (146). Des Weiteren kann CEACAM1 die zytotoxische Aktivität sowie IFN γ Sekretion von Tumorinfiltrierenden NK-Zellen inhibieren (90;94). Wie bereits beschrieben, können erhöhte Konzentrationen an löslichen CEACAM1 Molekülen im Serum von Melanomzellen detektiert werden (91). Diese löslichen Moleküle sind ebenfalls fähig mit NK-Zell-CEACAM1 zu interagieren und somit deren Effektorfunktion zu unterdrücken (86). Zusätzlich wird in Melanomzellen die Expression des immunprotektiven CEACAM1 durch IFN- γ verstärkt (53). Da IFN- γ durch zytotoxische Lymphozyten während der anti-tumoralen Immunantwort sezerniert wird (131), führt die so induzierte, kurzfristige Hochregulation der CEACAM1 Expression auf Melanomzellen zu einem optimalen Schutz vor einer solchen Immunantwort.

Neben dem direkten Einfluss auf die Aktivität von NK-Zellen, kann die CEACAM1 Expression in Tumorzellen auch zu einer indirekten Verringerung der Zytolyse von Tumorzellen führen. So konnte Richard S. Blumberg zeigen, dass die Expression von CEACAM1 in Kolonkarzinomzellen mit einer verringerten Oberflächenexpression von NKG2DL korreliert und dies zu einer verringerten NKG2D-vermittelten Lyse dieser Tumorzellen führt (21).

3. Ziel der Arbeit

Im menschlichen System werden potentiell vier verschiedene Spleißvarianten des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 (*Carcinoembryonic Antigen-related cell Adhesion Molecule 1*) exprimiert, welche sich in der Anzahl ihrer extrazellulären Domänen so wie der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen unterscheiden. Diese Isoformen werden mit CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S bezeichnet. CEACAM1 weist die höchste Gewebsverteilung aller CEACAM Moleküle auf. Es wird unter anderen in Epithelzellen, jedoch nicht in Melanozyten exprimiert, den Ursprungszellen des malignen Melanoms. Interessanterweise kann CEACAM1 jedoch in Melanomzellen neo-exprimiert werden und besitzt einen großen Einfluss auf die Zell-Motilität, Metastasierung und Immunogenität dieser Zellen. Es ist zu vermuten, dass die verschiedenen CEACAM1 Isoformen unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen, jedoch fehlen bislang jegliche Studien dazu.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die Untersuchung der klinischen und biologischen Relevanz der einzelnen CEACAM1 Isoformen im malignen Melanom erfolgen. Zunächst sollte das Expressionsmuster der unterschiedlichen Isoformen sowohl in Melanomzelllinien als auch in Melanombiopsien analysiert werden um anschließend retrospektiv Aussagen über die klinische Relevanz zu treffen.

Des Weiteren lag der Fokus dieser Arbeit auf der Evaluierung der biologischen Bedeutung der einzelnen CEACAM1 Isoformen für Melanomzellen. Es sollte zunächst eine CEACAM1 negative Zelllinie identifiziert, anschließend mit den unterschiedlichen CEACAM1 Isoformen transfiziert werden und die Effekte auf zelluläre Vorgänge, wie Migration und Invasion analysiert werden. Hierbei sollte auch der Einfluss auf die Immunogenität der Melanomzellen, mit Fokus auf die NK-Zell-vermittelte Immunantwort untersucht werden.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Zellen

Melanomzelllinie	Stadium ²
A375	Stadium unbekannt
Ma-Mel-8bIV	Stadium IV
Ma-Mel-16	Stadium IV
Ma-Mel-37a	Stadium III
Ma-Mel-45a	Stadium IV
Ma-Mel-48a	Stadium IV
Ma-Mel-48b	Stadium IV
Ma-Mel-57	Stadium IV
Ma-Mel-63a	Stadium IV
Ma-Mel-65	Stadium III
Ma-Mel-66b	Stadium IV
Ma-Mel-86a	Stadium IV
Ma-Mel-86b	Stadium IV
Ma-Mel-86c	Stadium IV
Ma-Mel-94	Stadium III
Ma-Mel-114	Stadium IV
Ma-Mel-142a	Stadium IV
Ma-Mel-174a	Stadium IV
UKE-Mel-1a	Stadium III
UKE-Mel-2a	Stadium IV
UKE-Mel-3a	Stadium II
UKE-Mel-4a	Stadium IV
UKE-Mel-5a	Stadium II
UKE-Mel-6a	Stadium III

² Stadium des Patienten bei Biopsie-Entnahme. Die Evaluierung der Krankheitsstadien wurde nach AJCC Kriterien durchgeführt.

UKE-Mel-7b	Stadium III
UKE-Mel-7g	Stadium III
UKE-Mel-8a	Stadium IV
UKE-Mel-9a	Stadium III
UKE-Mel-10a	Stadium IV
UKE-Mel-11a	Stadium IV
UKE-Mel-14a	Stadium III
UKE-Mel-14b	Stadium III
UKE-Mel-15a	Stadium IV
UKE-Mel-16a	Stadium IV
UKE-Mel-18a	Stadium III
UKE-Mel-19a	Stadium IV
UKE-Mel-20a	Stadium IV
UKE-Mel-21a	Stadium IV
UKE-Mel-22a	Stadium IV
UKE-Mel-23a	Stadium III
UKE-Mel-24a	Stadium IV
UKE-Mel-26a	Stadium III
UKE-Mel-27a	Stadium IV
UKE-Mel-28a	Stadium IV
UKE-Mel-29a	Stadium IV
UKRV-Mel-15a	Stadium IV

Alle Zelllinien wurden aus der Hautkrebsbiobank der Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Essen (*Skin Cancer Biobank*, SCABIO) bezogen. Die verwendeten Zelllinien wurden nach SOP (*Standard Operating Procedure*) etabliert, kultiviert und gelagert. Für die Entnahme und Verarbeitung des Tumormaterials lagen stets die Einverständniserklärung aller Patienten sowie die Genehmigung des zuständigen Prüfungsausschusses vor.

4.1.2. Bakterien

One Shot TOP10 (Invitrogen, C4040), chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen wurden verwendet, wie vom Hersteller empfohlen.

4.1.3. Oligonukleotide

Oligonukleotide für Standard-PCR Reaktionen

Bezeichnung	Leitstrang 5' → 3'	Folgestrang 5' → 3'	Fragmentgröße	Annealing Temperatur
CEACAM1	cagtgaccagtc accttga	rtgggtcattggag tggtcc	CEACAM1-4L=779 bp; CEACAM1-4S=726 bp; CEACAM1-3L=491 bp; CEACAM1-3S=438 bp.	58 °C
Aktin	accctgaagtacc ccat	tagaagcatttgcg gtg	931 bp	55 °C
Melan-A	tatcccaggtgtct ggagc	ccctgctgttcgaa gtcttc	536 bp	59 °C
Gp-100	gcagtgccttatgac ttcagtgg	aagcacttcctgag aaatcagc	389 bp	59 °C
TRP-1	ctcacatgattagt actgcta	caagatgccaaga gaagatg	276 bp	55 °C

TaqMan Gene Expression Assay für quantitative Echtzeit-PCR von Applied Biosystems

Bezeichnung	Applied Biosystems Referenznummer	Fluorophor / Quencher
ADAM-10	Hs01109565_m1	FAM / MGB
ADAM-17	Hs01041915_m1	FAM / MGB
CEACAM1	HS00992688_m1	FAM / MGB
GAPDH	Hs02786624_g1	FAM / MGB
MMP-14	Hs00237119_m1	FAM / MGB
MMP-2	Hs01548727_m1	FAM / MGB
TIMP-1	Hs00171558_m1	FAM / MGB
TIMP-2	Hs00234278_m1	FAM / MGB

Alle Primer wurden so gewählt, dass das Amplikon jeweils eine Exon-Exon Grenze überspannte. Dies ermöglichte es, die Detektion von potentiellen, genomischen DNA Kontaminationen auszuschließen.

4.1.4. Plasmide

Bezeichnung	Quelle	Verwendungszweck
pcDNA3-1(-)	AG Singer; Anatomie Universitätsklinikum Essen	Kontrollplasmid
pcDNA3-1(-)_CEACAM1-4S	AG Singer; Anatomie Universitätsklinikum Essen	CEACAM1-4S Überexpression
pcDNA3-1(-)_CEACAM1-3L	AG Singer; Anatomie Universitätsklinikum Essen	CEACAM1-3L Überexpression
pcDNA3-1(-)_CEACAM1-3S	AG Singer; Anatomie Universitätsklinikum Essen	CEACAM1-3S Überexpression
pcDNA3-1(-)_CEACAM1-4L	AG Singer; Anatomie Universitätsklinikum Essen	CEACAM1-4L Überexpression

4.1.5. Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Schnittstelle	Quelle
BbsI (200U/μl)	GAAGAC (N)2 CTTCTG (N)6	Fermentas
Hind III (Fast Digest)	A AGCTT TTCGA A	Fermentas
XhoI (Fast Digest)	C TCGAG GAGCT C	Fermentas

4.1.6. Polymerasen, Reverse Transkriptasen und Ligasen

Enzym	Quelle	Verwendungszweck
DreamTaq DNA Polymerase	Fermentas	Semiquantitative PCR
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs	Klonierung
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas	Reverse Transkription von total RNA zu cDNA
T4 DNA Ligase	Fermentas	Ligation

4.1.7. Antikörper

Bezeichnung (Klon)	Spezifität	Quelle	Applikation
Actin (C4)	monoklonal, Maus anti-human, IgG1	MP BioMedicals (691001)	Western Blot (1:10000)
Alexa Fluor® 488	polyklonal, Esel anti-Maus (Alexa-488 konjugiert)	Invitrogen (A21202)	IHC (1:700)
CD112 (829039), PE	monoklonal, Maus anti-human, IgG1	BD Biosciences (551057)	Durchflusszytometrie (1:2,5)
CD155 (SKII.4), PE	monoklonal, Maus anti-human, IgG1	BioLegend (337609)	Durchflusszytometrie (1:50)
CD3 MicroBeads	Monoklonal, Maus anti-human, IgG2a	Miltenyi (130-050-101)	MACS
CD56 MicroBeads	Monoklonal, Maus anti-human, IgG1	Miltenyi (130-050-401)	MACS
CEACAM1 (18/20)	monoklonal, Maus anti-human, CEACAM1 N-Terminus	AG Singer; Anatomie, Universitätsklinikum Essen	Durchflusszytometrie (1:50), IHC (10 µg/ml)
CEACAM1 (4/3/17)	monoklonal, Maus anti-human, CEACAM1 N-Terminus	Aldevron / AG Singer; Anatomie, Universitätsklinikum Essen	Western Blot (5 µg/ml), Durchflusszytometrie (1:50), IHC (10 µg/ml)

CEACAM1 (B3-17)	monoklonal, Maus anti-human CEACAM1 (A1/B Domäne)	AG Singer; Anatomie, Universitätsklinikum Essen	Durchflusszytometrie (1:50), IHC (10 µg/ml)
Cy-5	monoklonal, Ziege anti-Maus	Dianova (115-175- 146)	Durchflusszytometrie
FITC	polyklonal, Ziege anti-Maus (FITC konjugiert)	Dianova (115-096- 062)	IHC (1:200)
IgG, HRP	polyclonal, Hase anti-Ziege, IgG-HRP	Santa Cruz (sc-2768)	Western Blot 1:5000
IgG, HRP	Ziege anti-Maus, IgG-HRP	Southern Biotech (1031-05)	Western Blot 1:5000
MICA	polyklonal, Ziege anti-human, IgG1	R&D Systems (AF1300)	Western Blot (1 µg/ml)
MICA (AM01)	monoklonal, Maus anti-human, IgG1	Bamomab	Durchflusszytometrie (0,2 µg/ml)
NKp30/NCR1 Fc Chimer	Human, IgG1	R&D Systems (1849-NK-025)	Durchflusszytometrie 1 µg / 100 µl
NKp46/NCR1 Fc Chimer	Human, IgG1	R&D Systems (1850-NK-025)	Durchflusszytometrie 1 µg / 100 µl
Phalloidin	Konjugiert mit Alexa-488	Sigma (P1951)	IHC (25 µg/ml)
ULBP1	monoklonal,	R&D Systems	Durchflusszytometrie

(170818) ULBP2	Maus anti-human, IgG2A polyklonal, Ziege anti-human, IgG1	(MAB1380) R&D Systems (AF1298)	(1:50) Western Blot (1 µg/ml)
ULBP2 (BUMO1)	monoklonal, Maus anti-human, IgG1	Bamomab	Durchflusszytometrie (0,2 µg/ml)
ULBP3 (166510)	monoklonal, Maus anti- human, IgG2A	R&D Systems (MAB1517)	Durchflusszytometrie (1:25)

4.1.8. Medien, Zusätze und Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
0.05 % Trypsin-EDTA (1X)	Gibco	Zellkultur
10 x RPMI 1640	Sigma Aldrich	Soft-Agar Assay
6 x DNA Loading Dye	Fermentas	DNA Proben Puffer
CFSE/7-AAD Cell-Mediated Cytotoxicity Assay Kit	Cayman Chemical	CFSE/7-AAD basierter Zytotoxizitätsassay
Ampicillin	Sigma-Aldrich	Selektion von trasformierten Bakterien
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG	Dichtegradient
Cell Lysis Buffer (10 X)	Cell Signaling Technology	Proteinisolation
DMEM (1 g/l) liquid with L-Glutamine	PAA	Zellkultur
DPBS	Gibco	Zellkultur
Fetales Kälberserum (FCS)	GE Healthcare	Zellkultur
Fluoromount-G	Southern Biotech	Eindecken von IHC Proben
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas	DNA-Leiter
Geneticindisulfat (G418-Sulfat)	Carl Roth	Zellkultur, Selektion von transfizierten Zellen
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen	Plasmid Isolation
Hygromycin B-Lösung	Carl Roth	Selektion von transfizierten Zellen
jetPrime Transfektionsreagenz	Polyplus Transfection	Transfektion
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth	Agarplatten für Bakterien
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth	Medium für Bakterienkultur
L-Glutamine (200 mM)	GE Healthcare	Zellkultur
Matrigel Matrix Growth Factor Reduced	BD Biosciences	xCELLgence
MEM non-essential Amino Acids	Gibco	Soft-Agar Assay

Penicillin/Streptomycin (100 x) (Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml)	GE Healthcare	Zellkultur
peqGOLD Gel Extraktions Kit	Peqlab	Extraktion von DNA aus Agarosegelen
QIAprep Spin Miniprep Columns	Qiagen	Plasmid Isolation
RNeasy Mini Kit	Qiagen	RNA-Isolation
RPMI 1640 Medium	Gibco	Zellkultur
TaqMan Universal PCR Master Mix (2 x)	Applied Biosystems	TaqMan PCR

4.1.9. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Acrylamide:N-N'-methylene-bis-acrylamide Electrophoresis Purity Reagent 30 %	Biorad
Agarose	Peqlab
peqGOLD Universal-Agarose	
Albumin Fraktion V	Carl Roth
Ammonium persulfate, for electrophoresis 98 %	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin (2 mg/ml)	Biorad
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
EDTA	Sigma-Aldrich
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Methanol	J.T. Baker
Milchpulver, Blotting grade	AppliChem
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich

Natriumhydrogencarbonat	AppliChem
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich
Noble Agar	Difco
Paraformaldehyd	Riedel-de Häen
Ponceau solution	Sigma Aldrich
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Salzsäure	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich
Tris base	AppliChem
Triton X	Gerbu
Tween20	Gerbu
Universal-Agarose	Biobudget

4.1.10. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24 Well TC-Plate, sterile, with lid	Greiner bio-one
6 Well Zellkulturtestplatte	TPP
96 Well Multiply Fast PCR-Platte	Sarstedt
96 Well Cell Culture Plate, sterile, U-bottom, with lid	Greiner bio-one
96 Well Microplates, PS, F-bottom	Greiner bio-one
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich
CapLock Reaktionsgefäße 1,5 ml	TreffLab
CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 175 cm ² , 550 ml, PS, red filter cap, sterile	Greiner bio-one
CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 75 cm ² , 550 ml, PS, red filter cap, sterile	Greiner bio-one
ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Einmalpipetten CELLSTAR 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one
Kryo-Einfrier-Behälter	Nalgen
Kryo-Röhrchen 2 ml	Greiner bio-one
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystem
Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf
Westran PVDF 0,4 µm Membran	Westran
Zellschaber, 28 cm	Greiner bio-one

4.1.11. Kultivierungsmedien

Medien für die Zellkultur

RPMI 1640 (1x)	(Roswell Park Memorial Institute) Für die Kultivierung von humanen Melanomzellen wurde das Medium mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS (<i>fetal calf serum</i>) komplementiert.
Hungermedium	Um die Zellen zu hungern, wurde RPMI 1640 nur mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin komplementiert.
Einfriermedium	Fetales Kälber Serum versetzt mit 10 % DMSO
2 x RPMI 1640 für Soft-Agar-Assay	4 ml 10x RPMI 1640 4 ml FCS 400 µl nicht-essentielle Aminosäuren (100x) 0,08 g NaHCO ₃ Aqua dest. auf 20 ml auffüllen Mit 1 M NaOH den pH-Wert anhand der Farbe des Mediums einstellen.

Für die Selektion und Kultivierung der CEACAM1 transfizierten Melanomzellen wurde das komplementierte RPMI 1640 Medium mit 1 mg/ml Geneticindisulfat (G418-Sulfat) versetzt.

Medien für Bakterienkulturen

LB Medium wurde angesetzt mit 25 g/l LB-Medium (Luria/Miller), LB-Agar Platten wurden äquivalent dazu mit 40 g/l LB-Agar gegossen. Das Flüssigmedium wie auch die Agar-Platten wurden gegebenenfalls mit Ampicillin (150 µg/ml Endkonzentration) versetzt.

LB-Medium	Pepton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid (NaCl) 10 g/l pH 7,0
-----------	--

LB-Agar	Pepton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid (NaCl) 10 g/l Agar-Agar 15 g/l , pH 7,0
---------	--

4.1.12. Verwendete Puffersysteme

50 x TAE	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen
10 % SDS	10 g SDS 100 ml Aqua dest.
10 % APS	10 g Ammoniumpersulfat 100 ml Aqua dest.
1,5 M Tris-HCl (pH8.8)	90,85 g Tris-Base mit Aqua dest auf 500 ml auffüllen
1 M Tris-HCl (pH6,8)	36,33 g Tris Base auf 200 ml mit Aqua dest. auffüllen
Tricingelpuffer	0,5 % SDS 3 M Tris-HCl pH 8,5 mit Aqua dest. auffüllen
6 x Ladepuffer	3 ml 0,5 M Tris-HCl pH6,8 4,8 ml Glycerin 4,8 ml 10 % SDS 1,2 ml β -Mercaptoethanol 1,2 ml 0,5 % Bromphenolblau 1 ml Aqua dest.

5 x SDS-Gel Laufpuffer	30,2 g Tris-Base 100 ml 10 %SDS 188 g Glycin mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen und pH auf 8,3 einstellen
Tricingel Anodenpuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 8,9
Tricingel Kathodenpuffer	0,1 M Tricin 0,01 % SDS 0,21 M Tris-HCl, pH 8,3
10 x Blotpuffer	58,2 g Tris-Base 37,5 ml 10 % SDS 29,3 g Glycin auf 800 ml auffüllen
1 x Blotpuffer	100 ml 10 x Blotpuffer 700 ml Aqua dest. 200 ml Methanol
10 x TBS	121,4 g Tris-Base 160 g NaCl mit Aqua dest. Auf 2 l auffüllen und pH auf 7,5 einstellen
1 x Waschpuffer	100 ml 10 x TBS 895 ml Aqua dest. 5 ml Tween 20
5 % Magermilch	5 g Magermilchpulver 100 ml 1 x Waschpuffer
FACS-Puffer	500 ml PBS 1 % FCS 0,5 g Natriumazid gegebenenfalls wurde Propidiumiodid (2,5µg/ml) zugegeben

Zymographie

Substratpuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,6 5 mM Calciumchlorid
----------------	--

4.1.13. Verwendete Gele

1,5 %iges Agarosegel	2,25 g Agarose 150 ml 1 x TAE-Puffer 7µl Ethidiumbromid
10 %iges SDS-Trenngel	3,3 ml Aqua dest. 4 ml 30 % Acrylamid Mix 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH8,8) 100 µl 10 % SDS 10 µl 10 % APS 4 µl TEMED
5 %iges SDS_Sammelgel	1,4 ml Aqua dest 1,33 ml 30 % Acrylamid Mix 0,25 ml 1,5 M Tris-HCl (pH6,8) 20 µl 10 % SDS 20 µl 10 % APS 0,002 µl TEMED
9 %iges Tricin-Trenngel	2,25 ml 30 % Acrylamid Mix 2,5 ml Tricingelpuffer 2 ml Aqua dest. 0,75 ml Glycerin 37,5 µl 10 % APS 3,75 µl TEMED
4 %iges Tricin-Sammelgel	0,83 ml 30 % Acrylamid Mix 1,55 ml Tricingelpuffer 3,8 ml Aqua dest. 50 µl 10 % APS 5 µl TEMED

10 %iges Trenngel mit Gelatine	5 ml Gelatine-Lösung (3 mg/ml Gelatine in Aqua. dest) 5 ml 30 % Acrylamid Mix 1 ml Aqua. dest 3,8 ml Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8) 150 µl 10 % SDS 15 µl TEMED 150 µl 10 % APS
Sammelgel mit Gelatine	750 µl 30 % Acrylamid Mix 3,9 ml Aqua. dest 320 µl Tris/HCl (1 M, pH 6,8) 50 µl 10 % SDS 5 µl TEMED 80 µl 10 % APS

4.2. Methoden

4.2.1. Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1. Gesamt RNA-Isolation

Total-RNA Isolierung aus Zelllinien

Die adhärenenten Zellen wurden trypsinisiert, zentrifugiert und das erhaltene Pellet zweifach mit DPBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer (versetzt mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol) aufgenommen und die RNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert. Um Reste der genomischen DNA zu entfernen, erfolgte zusätzlich noch ein DNase I Verdau.

Total-RNA Isolierung aus Gewebe

Zur Isolation von total RNA aus kryokonservierten Geweben wurden 100 µg Probe mithilfe der Schwingmühle MM200 (Firma Retsch) pulverisiert und anschließend ebenfalls in 350 µl RLT Puffer (mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Nach dem das Gewebe vollständig über die QIAshredder Säule aufgeschlossen wurde, erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation bei voller Umdrehungszahl. Der Überstand wurde anschließend mit 70 % Ethanol versetzt

und die RNA über die Säulen des RNeasy Mini Kits entsprechend dem Handbuch isoliert und gereinigt. Hierbei wurde ebenfalls der DNase I Verdau durchgeführt.

4.2.1.2. Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die RNA und DNA Konzentration wurde photometrisch unter Verwendung des Spektrophotometers BioPhotometer Plus (Eppendorf) bestimmt. Um die Proben direkt messen zu können, wurde eine Mikrolitermesszelle verwendet. Hierbei wurden die Absorptionen bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 340 nm bestimmt. Die Absorption bei 230 nm ist ein Maß für die Verunreinigung mit Kohlenhydraten, Salzen oder organischen Lösungsmitteln und sollte einen Wert von 2 nicht überschreiten, bei 280 nm werden Protein- und Phenolkontaminationen gemessen. Die Absorption bei 340 nm sollte stets Null sein, da dies ein Maß für die Trübung der Probe ist. Nukleinsäuren absorbieren das Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Berechnung der Absorption erfolgt unter Verwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes:

$$E = \varepsilon * c * d$$

E	gemessene Extinktion
ε	molarer Extinktionskoeffizient
c	molare Konzentration
d	Schichtdicke [cm],

Zudem wurde die Reinheit der Proben durch das Verhältnis der Absorption von 260 nm zu 280 nm bestimmt, dieses sollte für RNA stets bei 2 liegen und für DNA bei 1,8. Einer Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht hierbei 40 µg/ml RNA oder 50 µg/ml DNA.

4.2.1.3. Reverse Transkription

Da für die Polymerase-Ketten-Reaktion DNA benötigt wird, wurden die einzelsträngigen RNA Moleküle durch reverse Transkriptase in komplementäre cDNA Stränge umgeschrieben. Hierzu wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) entsprechend dem beiliegenden Handbuch verwendet. Für jede Reaktion wurde 1 µg RNA eingesetzt.

Ansatz für die Reverse Transkription

1 µg	RNA
1 µl	<i>Random Hexamer Primer</i>
auf 12 µl mit RNase freiem Wasser auffüllen	
Inkubation für 5 min bei 65 °C	

Folgende Reagenzien wurden anschließend zugegeben:

4 µl	5x Reaktionspuffer
1 µl	Ribolock RNase Inhibitor
2 µl	10 mM dNTPs
1 µl	Reverse Transkriptase

Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C und 5 min bei 70 °C inkubiert.

4.2.1.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Während der Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) werden spezifische Abschnitte einer Matrizen-DNA exponentiell amplifiziert. Diese Bereiche der DNA werden durch komplementäre, sequenzspezifische Oligonukleotide (*Primer*) markiert, welche den Replikationsstart und das Replikationsende für die thermostabile Polymerase markieren. Das Temperaturoptimum der Polymerase, für die exponentielle Amplifikation, liegt bei 72 °C (102). Die Replikation geschieht stets in 5'→3' Richtung, jedoch muss hierzu die DNA einzelsträngig vorliegen, hierzu wird doppelsträngige DNA bei 95 °C aufgeschmolzen. Anschließend werden bei einer spezifischen Hybridisierungstemperatur die *Primer* an die einzelsträngigen DNA-Moleküle gebunden (*Annealing*), im folgenden Schritt lagert sich bei 72 °C die Polymerase an die Primer an und beginnt die spezifischen Bereiche in 3' Richtung zu amplifizieren. Die Schritte der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation werden zyklisch wiederholt. Am Ende folgt ein terminaler Elongationsschritt von 10 min.

Amplifikation mit DreamTaq Polymerase

Es wurde folgendes Standard-Temperaturprogramm verwendet:

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 1. 95 °C | 5 min (initiale Denaturierung) |
| 2. 95 °C | 45 sec (Denaturierung) |
| 3. Schmelztemperatur Primer | 35 sec (Annealing) |
| 4. 72 °C | 1 kb pro 30 sec (Elongation) |
| Schritt 2-4 zyklisch wiederholen | |
| 5. 72 °C | 10 min |
| 6. 4 °C | Kühlung |

Ansatz für semi-quantitative PCR

2,5 µl	10x DreamTaq Puffer
0,5 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	Primer 1
0,5 µl	Primer 2
19,8 µl	Aqua dest.
0,2 µl	DreamTaq Polymerase
1 µl	cDNA

Für die Quantifizierung der Expression der einzelnen CEACAM1 Isoformen, wurden die über ein Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte mittels ImageJ Software quantifiziert.

4.2.1.5. Elektrophorese und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Mittels Gelelektrophorese wurden PCR-Produkte ihrer Größe nach aufgetrennt und visualisiert. Für eine optimale Auftrennung wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden DNA-Fragmente 1 bis 3 %-ige Gele gegossen (siehe 4.1.13). Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80V in 1xTAE Laufpuffer. Die so aufgetrennten DNA Banden wurden unter Verwendung von Ethidiumbromid und UV-Licht visualisiert. Hierzu wurde eine Wellenlänge von 312 nm eingesetzt. Wenn die DNA für weitere Klonierungs- bzw. Sequenzierarbeiten benötigt wurde, geschah die Detektion der Banden mit langwelligeren UV-Licht (365 nm), da so das Risiko von UV-Schäden an der DNA vermindert werden konnte. Die DNA Aufreinigung geschah mittels peqGOLD Gel Extraktions Kit, entsprechend den Herstellerangaben.

4.2.1.6. Quantitative PCR (qRT-PCR)

Die sogenannte quantitative PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, jedoch ermöglicht sie zusätzlich die quantitative Messung von Expressionen verschiedener Zielgene (56). Die quantitative Messung der amplifizierten DNA geschieht nach jedem PCR Zyklus durch die Detektion von fluoreszierenden Farbstoffen, (SYBR Green) oder sequenzspezifischer, fluoreszenz-markierter Oligonukleotidsonden (TaqMan). Die TaqMan PCR hat gegenüber SYBR Green den Vorteil, dass sie in Echtzeit, nach jedem Zyklus, die Produktmenge misst und sich aufgrund der genspezifischen Oligonukleotide durch eine höhere Spezifität und Sensitivität auszeichnet. Die SYBR Green Farbstoffe binden jegliche

doppelsträngige DNA Moleküle, was unspezifische PCR-Produkte und Primer-Dimer mit einschließt, dies kann eine ungenaue Quantifizierung zur Folge haben. In dieser Arbeit wurde daher die TaqMan PCR-Methode verwendet, um die Expression verschiedener Gene zu quantifizieren. Hierbei werden sogenannte TaqMan Sonden verwendet, diese sind Oligonukleotide welche am 5' Ende mit einem Reporterfarbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein, FAM) markiert sind und am 3' Terminus einen Quencher tragen, welcher die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes unterdrückt. Die Bindung der markierten Oligonukleotide, mittig zwischen den genspezifischen Primern, an die cDNA führt zunächst noch nicht zu einem Fluoreszenzsignal, allerdings wird während der Elongationsphase durch die 5'-3' Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase der Reporterfarbstoff hydrolytisch von der Sonde abgespalten. Der freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches vom System detektiert wird. Mit jedem Zyklus akkumulieren mehr freie Reportermoleküle, was eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Diese Fluoreszenzintensität verhält sich somit proportional zur Menge an entstandenem PCR Produkt. Zusätzlich wird dem System ein Referenzfarbstoff z.B. ROX zugesetzt, welches als Referenz verwendet wird, um Messungenauigkeiten im Messsystem auszugleichen.

Die TaqMan Reaktion kann in drei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase nennt man lag-Phase, in welcher die emittierte Fluoreszenz nicht zu messen ist, da das Reaktionssystem ebenfalls eine geringe Eigenfluoreszenz aufweist. In der sich anschließenden exponentiellen Phase steigt die Fluoreszenzintensität mit jedem Zyklus der PCR an, der Zyklus an dem die Fluoreszenz der freigesetzten Sonden höher ist, als die Eigenfluoreszenz und somit vom System gemessen werden kann, ist als C_T -Wert definiert. Erst nachdem dieser Schwellenwert überschritten wurde, beginnt die Quantifizierung der PCR-Produkte. Der C_T -Wert wurde definiert als das Zehnfache der Standardabweichung der Fluoreszenzsignale in den Zyklen 3-15. Der Betrag dieses Wertes ist umso niedriger, je höher die Produkt-Konzentration in der Probe ist. Bei der dritten Phase handelt es sich um die Plateau-Phase, in welcher kein spezifisches Produkt mehr generiert wird und der Fluoreszenzanstieg abnimmt.

Alle Messungen erfolgten in technischen Triplikaten, für ein Triplikat wurde folgender Ansatz pipettiert:

15 µl	2x TaqMan Universal PCR Master Mix
1,5 µl	20x TaqMan Gene Expression Assay (Gen spezifisch)
10,5 µl	Aqua dest.

2,5 µl	CEACAM1 Promotor Folgestrang
3 µl	cDNA

Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

- | | |
|---|--------|
| 1) 95 °C | 10 min |
| 2) 95 °C | 15 sec |
| 3) 60 °C | 1 min |
| 4) 39-fache Wiederholung der Schritte 2-4 | |

Die erhaltenen Werte wurde relative zu einer endogenen Kontrolle quantifiziert. Als endogene Kontrollen dienten sogenannte Haushaltsgene wie β -Aktin, GAPDH und RNU6B. Diese Gene kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und werden in gleichen bzw. vergleichbaren Mengen exprimiert, weshalb sie in allen Reaktionsansätzen zu gleichen Mengen vorhanden sind. Die unterschiedlichen Expressionen wurden mit der $\Delta\Delta C_T$ Methode berechnet (83). Hierzu wurden zunächst zur Normalisierung die C_T -Werte der endogenen Kontrolle von den C_T -Werten des Zielgens subtrahiert, woraus sich der ΔC_T -Wert ergab. Dieser Wert wurde wiederum auf einen Kalibrator (Referenzprobe) normalisiert, das so erhaltene Ergebnis wird als $\Delta\Delta C_T$ -Wert definiert. Die Expression bezogen auf den Kalibrator wird als *fold-change* (Relative Expression) bezeichnet und ist wie folgt definiert:

$$fold\ change = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Diese Werte sind jedoch nicht normalverteilt, was jedoch für die statistische Auswertung mittels Student's t-Test Voraussetzung ist. Aus diesem Grund wurden für die statistische Auswertungen ausschließlich ΔC_T -Wert benutzt.

4.2.1.7. Klonierung von DNA Fragmenten in Vektoren

Zur Herstellung von Expressionsvektoren, welche spezifische Gensequenzen enthalten, wurde das jeweilige DNA Fragment (Insert) aus cDNA bzw. genomischer DNA mittels PCR amplifiziert. Die hierzu verwendeten PCR Primer beinhalteten in ihrer Sequenz 5' von der Gensequenz eine 4-6 bp lange Verbindungssequenz (*linker*) gefolgt von einer spezifischen Restriktionsschnittstelle. Das Insert und der Vektor wurden mit den jeweils gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend wurde das Insert unter Verwendung einer Ligase in das Plasmid ligiert. Zur Vervielfältigung des Vektors wurde dieser in kompetente Bakterien transformiert und anschließend isoliert.

Restriktionsverdau

Der Verdau von Plasmid und Insert geschah in einem 20 µl bzw. einen 30 µl Ansatz, entsprechenden den Herstellerangaben. Hierzu wurden Fast-Enzyme (Fermentas) verwendet.

	20 µl Ansatz für Plasmid-DNA	30 µl Ansatz für Insert
Aqua. Dest	15 µl	17 µl
10x FastDigest Buffer	2 µl	2 µl
DNA	1 µg	10 µl (~0,5µg)
Enzym	1 µl	1 µl

Die Inkubationszeit bei 37 °C betrug 5 min. Für die vollständige Inaktivierung der Restriktionsnukleasen schloss sich dem Verdau eine 10 minütige Inkubation bei 80 °C an.

Ligation

Nach dem Restriktionsverdau wurde die linearisierte DNA über ein Agarosegel separiert, wodurch die herausgeschnittenen Fragmente entfernt wurden und eine Autoligation verhindert werden konnte. Anschließend wurden die DNA Moleküle aus dem Gel eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 4.2.1.1.). Für die Ligation mittels T4 DNA Ligase von Insert und Plasmid-DNA wurde stets ein molekulares Verhältnis von Vektor zu Fragment von 1:1 und 1:5 angesetzt, dies geschah nach folgender Berechnung:

$$\text{Menge an Fragment [ng]} = \frac{\text{Menge Vector [ng]} * \text{Fragmentgröße [kb]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} * 1 \text{ bzw. } 5$$

Der Ligationsansatz setze sich wie folgt zusammen:

100 ng	linearisierte Vektor DNA
x ng	Insert DNA
2 µl	10x T4 DNA Ligase Puffer
1 U	T4 DNA Ligase
Mit Aqua dest. auf 20 µl Endvolumen auffüllen.	

Der Ligationsansatz wurde 10 min bei 22 °C inkubiert und anschließend wurden für die Amplifikation der entstanden, zirkulären Plasmide direkt 5µl dieses Ansatzes für die Transformation in kompetente Bakterien verwendet.

Transformation und Kultivierung von Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmiden wurden diese zunächst in chemisch-kompetente *Escherichia coli* (One Shot® TOP10, Invitrogen) Zellen transformiert. Hierzu wurden die Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut, mit 5-100 ng DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Daran schloss sich ein 30 sek. Hitzeschock bei 42 °C an, gefolgt von einer erneuten 2 minütigen Inkubation auf Eis. Die transformierten Zellen wurden mit 250 µl SOC Medium versetzt und bei 37°C und 100 rcf in einem Thermoschüttler für 2 h inkubiert. Zum Heranziehen von Einzelkolonien wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf mit Antibiotikum versetzten Agaplaten angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am Folgetag wurden einzelne Kolonien gepickt, in 6 ml Selektivmedium überführt und erneut über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wenn bereits sequenzierte Plasmide transformiert und in größeren Mengen benötigt wurden, konnten die einzelnen Kolonie direkt in 300 ml selektiven LB-Medium überführt werden. Die Plasmide wurde entweder mittels Mini-Präparation oder Maxi-Präparation isoliert.

Plasmid-DNA Isolation

Entsprechend der Zielsetzung des Versuches wurde eine Mini-Präparation (QIAprep Spin Miniprep) oder eine Maxi-Präparation (HiSpeed Plasmid Maxi Kit) entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Beide Systeme beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse.

4.2.2. Proteinbiochemische Methoden

4.2.2.1. Proteinisolierung und Western Blot

Zur Isolation von Proteinen aus Zellen wurden diese zunächst trypsinisiert (siehe 4.2.3.1) und das Pellet anschließend zweifach mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurde in einer angemessenen Menge 1-fach Cell Lysis Buffer (NEB) aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zytolyse wurden die Zellsuspension 15 min bei 15000 g zentrifugiert und der Überstand, welche die isolierten Protein beinhaltet, abgenommen.

Die Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Bradford Test. Hierzu wurde eine Coomassie-Brilliant-Blau haltige Bradfordlösung zu dem Proteinlysate gegeben. Das Bradford-Reagenz reagiert dabei mit den kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine und bildet einen Farbstoff-Protein-Komplex, was zu einer Verschiebung der Absorptionswellenlänge von 470 nm auf 595 nm führt. Diese Absorption konnte mittels Spektrometer photometrisch detektiert werden und wurde anschließend für die Berechnung der Konzentration verwendet.

Anschließend wurden 20-70 µg Protein, in Abhängigkeit der Kammgröße des Acrylamid-Gels und des Zielproteins in 1-fach Ladepuffer aufgenommen und 10 min bei 95 °C denaturiert. Da im Ladepuffer β-Mercapthoethanol enthalten ist, wird durch das Aufkochen der Probe das Protein entfaltet, denaturiert und die Disulfidbrücken aufgespalten. Natriumdodecylsulfat (SDS), führt zusätzlich zu einer konstanten, negativen Ladung der Proteine. Dies ermöglicht es die Proteine ihrer molekularen Masse nach in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bei 100-150 V aufzutrennen.

An diesem Elektrophoreseschritt schloss sich ein weiterer an, welcher den einstündigen Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF Membran vorsah. Hierzu wurde das halbtrockene (*semi-dry*) Blotverfahren angewendet. Der Aufbau erfolgte nach dem sogenannten Sandwichprinzip, welches wie folgt durchgeführt wurde: a) Auflegen des mit Blotpuffer durchtränkten, extra-dicken Filterpapiers auf die Anodenplatte, b) Positionierung der Membran, c) Auflegen des SDS-Polyacrylamidgels d) abschließend wurde eine weitere Lage extradickes Filterpapier aufgelegt. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde bei 15V.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1h mit 5 % Magermilch / TBS-T blockiert und anschließend 3 x mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers, welcher in Blockierungspuffer verdünnt wurde (siehe 4.1.7). Dieser inkubierte über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde der Blot 3 x mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper, welcher ebenfalls in Blockierungslösung verdünnt wurde, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperbindung wurde mittels ECL (*enhanced chemiluminescence*) visualisiert. Hierbei wird durch die an den Zweitantikörper konjugierte Peroxidase das Substrat Luminol oxidiert, wodurch es zur Chemolumineszenz kommt, welche mittels des FusionFX7 Systems (PeqLab) detektiert werden kann.

4.2.2.2. Zymographie

Die durchgeführte Gelatine-Zymographie dient dem Nachweis der proteolytischen Aktivität der Gelantinasen MMP-2 und MMP-9 (Matrix-Metalloproteasen). Da diese Proteasen sekretiert werden, wurden die im konditionierten Medium enthaltenen Proteine unter denaturierenden (mit SDS) aber nicht unter reduzierenden (ohne β-Mercapthoethanol) Bedingungen über SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei enthielt das Polyacrylamid-Gel denaturiertes Kollagen (Gelatine) als Substrat für die Matrix-Metalloproteasen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine, wird das SDS durch eine 15-minütige Inkubation mit 2,5 % Triton-X-100 entfernt, wodurch eine Renaturierung der Proteasen bewirkt wird. Nach zwei 7-minütigen Waschschr

Substratpuffer wurden die Gele in eben diesem Substratpuffer über Nacht bei 37 °C inkubiert. Hierbei wird die Gelatine enzymatisch durch die renaturierten MMPs degradiert. Am darauffolgenden Tage wurden die Gele mit Aqua dest. gewaschen und die Proteine darin durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt in Fixierungs-/Entfärbungspuffer (siehe 4.1.12) fixiert. Die proteolytische Aktivität kann durch Coomassie-Blau Färbung visualisiert werden. Hierbei sind die Größe und Intensität der klaren Banden (degradiertes Kollagen) im blauen Gel ein Maß für die enzymatische Aktivität der MMPs.

4.2.3. Zellbiologische Methoden

4.2.3.1. Kultivierung von Melanomzellen

Auftauen von kryokonservierten Melanomzellen

Die aus dem Stickstoff entnommen Zellen wurden im 37 °C warmen Wasserbad schnell angetaut und anschließend in komplementiertes RPMI 1640 Medium überführt. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 800 rcf wurde der Überstand verworfen und die Zellen in komplementierten RPMI 1640 resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank unter Normalbedingungen kultiviert.

Kultivieren und Passagieren von Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden, stets bei 37 °C und 5 % CO₂ in komplementierten RPMI 1640 kultiviert. Eine Konfluenz von 80% wurde nie überschritten. Zum passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit DPBS gewaschen und anschließend mit 0,05 % Trypsin-EDTA versetzt. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in Kultivierungsmedium aufgenommen und 5 min bei 800 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einem Zelllinien-spezifischen Split-Verhältnis wieder ausgesät.

Die Zellzahl wurde mittels automatisierten TC20 Zellzähler (BioRad) bestimmt.

Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium (siehe 4.1.12) suspendiert und in Kryo-Röhrchen überführt. In einem mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrier-Behälter wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren und anschließend im Flüssigstickstoff gelagert.

Generierung von Einzelzellklonen

Einzelzellklone wurden durch das Verfahren der limitierten Verdünnung generiert. Hierzu wurden die Zellen so verdünnt, dass sich in 200 µl Kultivierungsmedium statistisch nur eine

Zelle befindet, diese 200 µl wurden anschließend in eine Vertiefung einer 96-Well Platte ausplattiert. Das Kultivierungsmedium mit Antibiotikum wurde alle 3 Tage gewechselt. Herangewachsene Einzelzellklone wurden trypsinisiert und nach und nach in größere Kultivierungseinheiten überführt. Letztlich wurde die Expression von CEACAM1 auf der Oberfläche der Einzelzellklone mittels Durchflusszytometrie überprüft und die positiven Klone weiter kultiviert.

4.2.3.2. Transfektion humaner Zellen

Für eine effektive Transfektion der Zellen ist eine optimale Konfluenz erforderlich. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit einer Zelllinien-spezifischen Zellzahl 24 h vor der Transfektion in einer 6-Well Platte so ausgesät, dass zum Zeitpunkt der Transfektion die Zellen eine Konfluenz von ca. 80 % besaßen. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium der Zellen durch 2 ml frisches Kultivierungsmedium ersetzt und unter Verwendung des Transfektionsreagenz jetPRIME die Zellen mit siRNA oder Plasmiden transfiziert.

Hierzu wurden 110 pmol siRNA zu einer Endkonzentration von 50 nM bzw. 2 µg DNA in 200 µl jetPRIME Puffer verdünnt. Anschließend wurden 4 µl jetPRIME Transfektionsreagenz gegeben, 10 sek. auf dem Vortexer geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurde der Transfektionsmix tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch schwenken gut vermischt. Anschließend wurde die gesamte Multiwell-Platte 5 min bei 130 rcf zentrifugiert. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt und die Zellen für die benötigte Zeit unter Standardbedingungen inkubiert.

Zur Generierung von stabilen Zellklonen, wurden die Zellen 48 h nach Transfektion unter selektiven Bedingungen kultiviert. Hierzu wurden 1 mg/ml Geneticinsulfat dem komplementierten Kultivierungsmedium zugegeben. Nach 14-tägiger Selektion wurde durch limitierte Verdünnung (siehe 4.2.3.1) Einzelklone generiert, welche stets unter selektiven Bedingungen kultiviert wurden.

4.2.3.3. xCELLigence

Das xCELLigence System der Firma ACEA Biosciences stellt eine markierungsfreie Methode dar, Zell - Proliferation, - Migration, - Invasion und Zelltod in Echtzeit zu analysieren. Hierbei befinden sich am Boden der Multiwell-Platte (E-Platten) bzw. zwischen 2 Transwells (CIM-Platten) Mikrogoldelektroden durch welche, während der Messung ein elektrischer Strom mit einer Spannung von 30 mV geleitet wird. In definierbaren Intervallen misst das

Gerät die Veränderungen des Wechselstromwiderstandes zwischen diesen Elektroden. Die Impedanz der Elektroden wird zum einen durch die Ionendichte des Mediums beeinflusst und zum anderen durch adhärente Zellen. Wenn Zellen an die Elektroden adhäreren, wirken sie wie eine Art Isolator, was zu einem Anstieg der Impedanz führt. Durch Bestimmung der Impedanz kann nun die Zellzahl, sowie morphologische bzw. physiologische Veränderungen der Zellen analysiert werden. Hierbei verändert sich die Impedanz durch die Änderung in der Anzahl der adhärenen Zellen, durch Größenveränderung dieser Zellen als auch durch Veränderungen in der Adhäsionsstärke.

Der Zellstatus wird vom Gerät als Zellindex (CI) angegeben, hierbei handelt es sich um einen dimensionslosen Parameter, welcher die Veränderung des Wechselstromwiderstandes beschreibt.

$$CI = \frac{Z_i - Z_0}{15}$$

Z_i Impedanzwert des Messpunktes

Z_0 Impedanzwert des Startzeitpunktes

Proliferationsanalysen

Die Zellen wurden 48 h vor dem Start des Experiments so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine 80 %ige Konfluenz aufwiesen. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen abtrypsinisiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 4.2.3.1). Zunächst wurden 50 µl Kultivierungsmedium in alle Vertiefungen einer E-Platte gegeben und der Z_0 Wert (Hintergrund) ermittelt, daraufhin wurden $2 \cdot 10^4$ Zellen in 100 µl Kultivierungsmedium zugegeben und die Messung gestartet.

Migrations- und Invasionsanalysen

Für die Analyse der Zellmotilität wurden die Zellen 48 h vor dem Experiment in einer Zelldichte ausgesät, dass am Folgetag eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht war. 24 h vor dem Versuch wurde das Kultivierungsmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Hungermedium ersetzt. Anschließend wurden die Zellen erneut 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Für die Motilitätsanalysen wurden CIM-Platten verwendet, welche aus einer unteren und einer oberen Kammer bestehen, die durch Goldmikroelektroden getrennt werden. Die Elektroden sind mit einer Kunststoffschicht auf der Oberseite beschichtet, so dass nur durch die Elektroden gewanderte Zellen auf der Unterseite der Elektroden detektiert werden.

a. Migrationsanalyse

Zunächst wurde 160 µl FCS-haltiges Medium in die Wells der unteren Kammer gegeben und die CIM-Platte assembliert. In die Vertiefungen der oberen Platte wurde zunächst 50 µl Hungermedium geben und anschließend die Hintergrundmessung durchgeführt. Danach wurden $1,2 \cdot 10^5$ Zellen in 100 µl Hungermedium in den oberen Teil der Platte hinzugeben und die Messung gestartet.

b. Invasionsanalysen

Zur Untersuchung der Invasionsfähigkeit von Melanomzellen wurde wachstumsfaktorreduziertes Matrigel als Ersatz für die extrazelluläre Matrix verwendet. Es wurden zunächst in jede Vertiefung der oberen Kammer 50 µl Matrigelverdünnung (1:60 mit Hungermedium) geben und direkt 30 µl wieder abgenommen. Dieser Schritt stellt sicher, dass sich die Matrigelverdünnung optimal im Well verteilt und die Mikroelektroden komplett von der extrazellulären Matrix umgeben sind. Anschließend wurde der obere Teil der CIM-Platte 4 h bei 37 °C inkubiert, in dieser Zeit polymerisiert das Matrigel aus. Nach dieser Polymerisationsphase wurde 160 µl FCS-haltiges Medium in die Kammern des unteren Plattenteils gegeben und die Platte assembliert. Anschließend wurde äquivalent zu den Migrationsanalysen 30 µl Hungermedium zugegeben, die Hintergrundmessung durchgeführt, 100 µl Hungermedium mit $1,2 \cdot 10^5$ Zellen hinzugegeben und die Messung gestartet.

Jede Messung erfolgte in Triplikaten. Die Zellindices wurden während den ersten 8 h alle 5 min und anschließend alle 15 min gemessen.

Zytotoxizitätsanalysen

Um die NK-Zell-vermittelte Zytolyse von Melanomzellen zu messen, wurden die Effektorzellen und die Zielzellen in einer E-Plate 16 Platte ko-kultiviert. Hierzu wurden zunächst 50 µl Normalmedium in die Wells einer E-Plate 16 vorgelegt und der Leerwert gemessen, anschließend wurden $2 \cdot 10^4$ Melanomzellen in 100 µl Medium, die zuvor 48 h bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert wurden, hinzugegeben und 10 h unter Normalbedingungen inkubiert. Der Zellindex wurde alle 10 min gemessen. Nach der Inkubation wurden die zuvor isolierten und mindestens 24 h mit IL-2 aktivierten NK-Zellen (Isolation, siehe 4.2.5.1 und 4.2.5.2) in einem spezifischen Effektor zu Zielzell-Verhältnis in 50 µl Normalmedium hinzugegeben. Anschließend wurde die Platte erneut für 24 h in den Inkubator gestellt. Die spezifische Lyse wurde hierbei nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{[nCI(\text{ohne Effektor})] - nCI(\text{mit Effektor})}{nCI(\text{ohne Effektor})} * 100$$

nCI normalisierter Zellindex (normalisiert auf Zeitpunkt der NK-Zell-Zugabe)

4.2.3.4. **Soft-Agar Kolonie-Assay**

Ein charakteristisches Merkmal maligner Tumorzellen ist das autonome Wachstum ohne Kontakt zu einem spezifischen Untergrund. Diese Fähigkeit der Melanomzellen kann mittels Soft-Agar-Assay untersucht werden. Hierbei wurden 1 % Noble-Agar mit 2-fachem RPMI (siehe 0) 1:1 vermischt und jeweils 1 ml dieses Grund-Agars in einem 6-Well verteilt. In der Zwischenzeit wurde 0,4 %iger Top-Agar mit 2-fachem RPMI 1:1 vermischt, was eine 0,2 %ige Endkonzentration ergibt. Hierzu war es nötig beide Agarsorten auf 40 °C zu erhitzen. Nach der Aushärtung wurden die zu analysierenden Zellen abtrypsinisiert und 2500 Zellen in 0,2 %igen Top-Agar aufgenommen und auf dem Grund-Agar ausplattiert. Nach Aushärten des Top-Agars bei Raumtemperatur wurden 500 µl Kultivierungsmedium auf dem Top-Agar gegeben und wöchentlich gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach 14 Tagen wurde ein zufällig gewählter Quadratzentimeter mittels Zeiss AxioObserver.Z1 und Apotome Mikroskop fotografiert und die Anzahl, sowie die Größe der Kolonien bestimmt. Als Kolonien wurden Zellaggregate mit einem Durchmesser $\geq 30 \mu\text{m}$ definiert.

4.2.4. **Immunhistochemie (IHC)**

Zur Evaluierung der zellulären Lokalisation von Proteinen in den zu analysierenden Melanomzellen wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Hierbei wird das Zielprotein mittels monoklonalem bzw. polyklonalem Antikörper markiert. Monoklonale Antikörper erkennen ein spezifisches Epitop der Zielproteine während polyklonale Antikörper spezifische für zwei oder mehr Epitope sind. Zur Visualisierung der primären Antikörper wurden sekundäre Antikörper verwendet, an welche ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist und die gegen den Organismus gerichtet sind, in welchem der erste Antikörper generiert wurde.

4.2.4.1. **Standard-Färbeprotokoll**

Zunächst wurden die Zellen für zwei bis drei Tage auf Deckgläsern in einer 24-Well Platte kultiviert. Wenn die gewünschte Konfluenz erreicht war wurden die Deckgläser, mit den Zellen darauf, 2-fach mit PBS gewaschen und anschließend 30 min in 3 % (w/v) BSA / PBS blockiert. Nach der Blockierung wurde der Erstantikörper in 1,5 % (w/v) BSA / PBS verdünnt (Verdünnungsverhältnis siehe 4.1.7) und die Zellen über Nacht bei 4 °C in einer feuchten

Kammer zusammen mit dem primären Antikörper inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Deckgläser erneut 2-fach in PBS gewaschen und in der feuchten Kammer 1 h bei Raumtemperatur zusammen mit dem Zweitantikörper inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ggf. 10 min mit DAPI (1:1000) in PBS inkubiert um das Chromatin und damit die Zellkerne zu markieren. Die gefärbten Zellen wurden mittels Fluoromount-G eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C gelagert.

4.2.4.2. CEACAM1 und Phalloidin Co-Färbung

Die Zellen wurden bis zu einer 80 %-igen Konfluenz auf Deckgläsern kultiviert und anschließend 2 x 5 min. mit PBS gewaschen. Nach der 15 minütigen Fixierung mit 3 % Paraformaldehyd, wurden die Zellen 3-fach mit PBS gewaschen und permeabilisiert. Hierzu wurden sie 2 min mit 0,05 % Triton-X-100 (in Aqua. dest.) behandelt. Die Markierung des F-Aktins geschah mittels Phalloidin. Die Zellen wurden mit 0.025 mg/ml Phalloidin in PBS in einer feuchten Kammer für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3-mal für 10 min mit PBS gewaschen und wie in 4.2.4.1 erklärt für CEACAM1 gefärbt und eingedeckt.

4.2.5. Immunologische Methoden

4.2.5.1. Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Die Separation der peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMCs) aus Buffy-Coats³ gesunder Spender erfolgte über einen Dichtegradienten. Bei einem „Buffy-Coat“ handelt es sich um die zellulären Bestandteile einer 500 ml Vollblutspende, diese werden durch Zentrifugation vom Plasma und der erythrozytären Phase des Blutes separiert. In einem 50 ml Reaktionsgefäß wurden 15 ml Biocoll (1,077g/ml) Lösung vorgelegt und diese mit 35 ml Buffy-Coat Verdünnung (1:1 mit PBS) überschichtet. Im anschließenden Zentrifugationsschritt (30 min, 1200 g, ohne Bremse) wurden die Zellen entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt, wobei sich drei Schichten bildeten. Die Granulozyten und Erythrozyten werden pelletiert, in der farblosen Interphase akkumulieren die PBMCs und der Überstand besteht aus Thrombozyten und Blutplasma. Die PBMCs wurden mithilfe einer Pasteurpipette abgenommen und erneut für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 50 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die PBMCs in

³ Die Buffy-Coats wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt.

einer Dichte von 3×10^6 Zellen pro ml ausgesät und unter Standardbedingungen in Normalmedium, versetzt mit 20 IU/ml Interleukin-2 (IL-2) bis zu einer Woche lang kultiviert.

4.2.5.2. Isolierung NK-Zellen aus PBMCs

NK-Zellen wurden mittels MACS (magnetic cell sorting) – Technologie aus dem zuvor gewonnenen PBMCs (siehe 4.2.5.1) separiert. Hierbei binden Antikörper, welche an magnetische Partikel konjugiert sind, an spezifischen Epitope auf der Oberfläche der Zellen und durch Anlegen eines magnetischen Feldes während der Elution, werden die so markierten Zellen zurückgehalten.

Für die Isolierung der NK-Zellen wurden mittels dieser Methode zunächst die CD3 positiven (T-Zell-spezifischer Marker) Zellen depletiert und anschließend die CD56 positiven Zellen separiert. Hierzu wurden die PBMCs mit PBS gewaschen, gezählt und bei 1000 rcf 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 1,6 ml MACS-Puffer resuspendiert und zusammen mit 15 µl CD3 spezifischen MACS-Mikrobeads je 10^7 Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde zweifach mit MACS Puffer gewaschen und die markierten Zellen in 3 ml MACS Puffer auf die entsprechenden Deletions-Säulen gegeben, welche zuvor mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert wurden. Die Säulen wurden zweifach mit 1 ml MACS-Puffer gespült, so dass nur die CD3 negativen Zellen eluiert werden konnten.

Der Durchfluss, welcher die CD3 negativen Zellen enthielt, wurde zentrifugiert und in 800 µl MACS-Puffer resuspendiert. Es wurden erneut 15 µl CD56 spezifischer MACS Mikrobeads zugeben und anschließend erneut 20 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligen waschen der Zellen mit MACS-Puffer wurden die Zellen auf die zuvor äquilibrierte Separations-Säule gegeben. Alle CD56 positiven Zellen wurden auf Grund ihrer magnetischen Markierung zurückgehalten, während alle negativen Zellen sich im Durchfluss befanden. Nach zweimaligen Spülen der Säule mit 3 ml MACS-Puffer wurden die Zellen eluiert. Hierzu wurde die Säule vom Magneten entfernte, 5 ml Kultivierungsmedium auf die Säule gegeben und mit Hilfe des, zur Säule gehörigen, Stempels die Zellen von der Säule gespült. Die Zellen wurden erneut pelletiert und anschließend mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen pro ml Kultivierungsmedium mit 200 IU IL-2 für 1-7 Tage unter Standardbedingungen kultiviert.

4.2.5.3. CFSE/7-AAD-basierter Zytotoxizitätsassay

Unter Verwendung der Farbstoffe Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) wurde die NK-Zell-vermittelte Lyse von Melanomzellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Zunächst wurden Rundboden-96-Well

Platten mit poly-Hema beschichtet, um eine Adhäsion der Melanomzellen zu verhindern. 1 g / ml poly-Hema wurde in 50 ml Ethanol bei 65 °C gelöst und anschließend in die Vertiefungen der Multiwellplatte gegeben. Nach dem Verdampfen der Lösung konnten die Platten bei 4°C bis zum Start des Versuches gelagert werden. Dazu wurden 1×10^6 Melanomzellen mit 20 nM CFSE markiert. Hierbei wurden 2×10^6 Zellen in 1 ml PBS aufgenommen, mit 20 nM CFSE in DMSO versetzt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 ml FCS und 8 ml PBS zugegeben. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und gezählt. Die zuvor isolierten NK-Zellen (4.2.5.2) wurden ebenfalls gezählt und entsprechend dem Effektor zu Target-Verhältnis in die jeweiligen Vertiefungen in 100 µl Kultivierungsmedium vorgelegt. Für die Ko-Kultivierung wurden anschließend 5×10^4 Zellen in 100 µl zu den NK-Zellen gegeben und unter Standardbedingungen 2 h 40 min inkubiert. Um die toten Zellen zu visualisieren, wurden die Zellen pelletiert, in 250 µl 1 x 7-AAD aufgenommen, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

Die prozentuale, spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = 100 * \frac{(\% \text{ tote Zellen} - \% \text{ spontan tote Zellen})}{(100 - \% \text{ spontan tote Zellen})}$$

4.2.5.4. Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich, unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper, quantitative Aussagen über die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf Zellen treffen. Die Zellen wurden zunächst trypsinisiert (4.2.3.1) und anschließend wurden 2×10^5 Zellen in 200 µl FACS-Puffer (siehe 4.1.12) resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend bei 130 rcf 5 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen 2-fach mit FACS-Puffer gewaschen und in 50 µl FACS-Puffer mit einer entsprechenden Konzentration (siehe 4.1.7) an primären Antikörper resuspendiert. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert und 2-fach mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Detektion des primären Antikörpers, wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer mit sekundärem Antikörper aufgenommen. Erneut wurden die Zellen auf Eis für 30 min inkubiert. Abschließend erfolgten drei weitere Waschrunde und abschließend wurden die Zellen in 250 µl FACS-Puffer mit Propidiumiodid (2,5 µg/ml) aufgenommen und in ein spezielles Durchflusszytometrie-Gefäß überführt. Durch die Zugabe des Propidiumiodids

konnten apoptotische Zellen diskriminiert werden. Die MFI Werte (mittlere Fluoreszenzintensitäten) wurden für die statistische Auswertung verwendet.

4.2.6. Statistische Auswertung

Der statistische Vergleich von quantitativen Expressionswerten zweier Gruppen wurde mittels Mann-Whitney U Test durchgeführt. Der Einstichproben *t*-Test gegen den hypothetischen Wert 0 wurde durchgeführt, wenn eine der zu vergleichenden Gruppen den Wert Null erhielt. Kaplan-Meier Überlebenskurven wurden in Kooperation mit Prof. Dr. André Scherag⁴ angefertigt. Hierbei wurden die verschiedenen Gruppen mittels log-rank Statistik verglichen. Bei allen weiteren Versuchen wurden die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit dem entsprechenden Standardfehler (\pm SEM) dargestellt und jeweils zwei Gruppen mittels Student's *t*-Test verglichen.

Alle dargestellten p-Werte sind nominal und zweiseitig. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: $\alpha \leq 5\%$ ($p \leq 0,05, *$), $\alpha \leq 1\%$ ($p \leq 0,01, **$), $\alpha \leq 0,5\%$ ($p \leq 0,005, ***$). Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm GraphPad Prism 5.03 verwendet.

⁴ Integriertes Forschungs- und Behandlungszentrum (IFB) Sepsis und Sepsisfolgen Center for Sepsis Control and Care (CSCC), Universitätsklinikum Jena, Erlanger Allee 10, 07747 Jena

5. Ergebnisse

Es werden von ca. 59 % der humanen Gene multiple mRNAs durch alternatives Spleißen generiert (34), so auch von CEACAM1. Die folgenden vier CEACAM1-Spleißvarianten konnten bisher im humanen System identifiziert werden; CEACAM1-3S, CEACAM1-3L, CEACAM1-4S und CEACAM1-4L. Weiterhin wurde bereits gezeigt, dass das alternative Spleißen die Translationsregulation modulieren kann, außerdem die Stabilität der mRNA, die Lokalisation und Funktionalität der kodierten Proteine beeinflusst (35). Basierend auf diesen Erkenntnissen stellt sich nun die Frage nach der biologischen und klinischen Relevanz des alternativen Spleißens von CEACAM1. In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen zellulären Effekte der CEACAM1 Spleißvarianten im malignen Melanom analysiert.

5.1. Expressionsmuster der CEACAM1 Isoformen im malignen Melanom

Die Spleißvarianten von CEACAM1 unterscheiden sich in der Anzahl ihrer IgG-ähnlichen, extrazellulären Domänen und der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen. Im malignen Melanom stellt CEACAM1 ein neo-Epitop dar, da es in Melanozyten nicht exprimiert wird (152). Die Expressionsverhältnisse aller vier CEACAM1 Isoformen wurden in ihrer Gesamtheit bisher noch in keiner Tumorentität analysiert. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Expressionsverhältnisse von CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S in Melanomzelllinien und –biopsien mittels semiquantitativer RT-PCR evaluiert. Auf Grund der hohen Anzahl an Polymorphen-Sequenzabschnitten (SNP-Sequenzen) in der CEACAM1 Sequenz und der hohen Sequenzhomologie der einzelnen Isoformen untereinander war es nicht möglich eine Isoform-spezifische quantitative RT-PCR zu etablieren. Daher basieren die folgenden Daten auf der Durchführung von semi-quantitativen Analysen mittels RT-PCR. Die Primer wurden so gewählt, dass der Leitstrangprimer vor der A2-Domäne und der Folgestrangprimer am Ende der zytoplasmatischen Domäne hybridisiert. Bei dieser RT-PCR entstehen daher vier unterschiedlich lange PCR-Produkte, welche jeweils für eine CEACAM1-Isoform spezifisch sind (Abbildung 4).

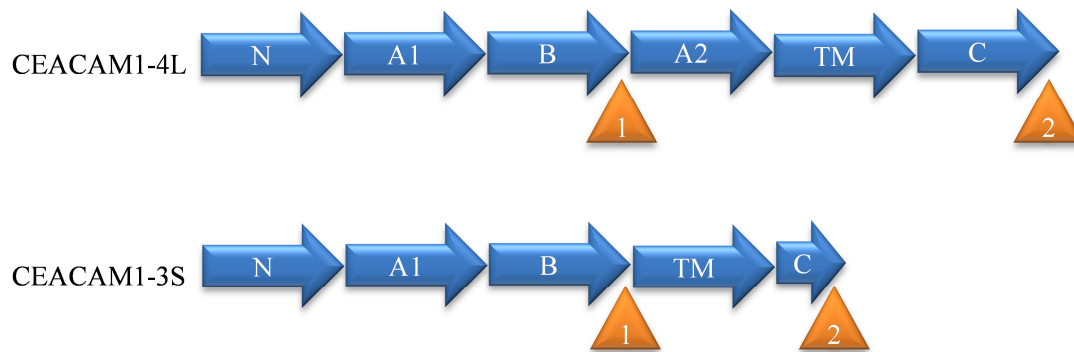


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Primerlokalisierung für die semi-quantitative RT-PCR zur Analyse der CEACAM1 Isoformen-Expression

Die Bindestellen für die verwendeten Primer sind hier am Beispiel von CEACAM1-4L und CEACAM1-3S dargestellt. Die Primer wurden so gewählt, dass durch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit der A2-Domäne (unterscheidet zwischen CEACAM1-4 und CEACAM1-3) und die variable Länge der zytoplasmatischen Domäne (unterscheidet CEACAM1-L und CEACAM1-S) vier unterschiedlich lange Produkte in der PCR entstehen, welche anschließend densitometrisch quantifiziert werden konnten. CEACAM1-4L=779 bp; CEACAM1-4S=726 bp; CEACAM1-3L=491 bp; CEACAM1-3S=438 bp. Die blauen Pfeile repräsentieren die einzelnen Domänen, die orangefarbene Dreiecke die gewählten Primer. 1, Leitstrangprimer; 2, Folgestrangprimer; N, N-terminale Domäne; A1,B,A2, konstante Ig-ähnliche Domänen; TM, transmembrane Domäne; C, zytoplasmatischer Teil.

Insgesamt wurden 46 Zelllinien, welche aus Melanometastasen von Stadium III und IV Patienten etabliert wurden, auf ihre Expression der einzelnen CEACAM1 Isoformen untersucht. Hierzu wurden semi-quantitative RT-PCRs durchgeführt und die jeweiligen Bandenintensitäten mittels ImageJ Software densitometrisch quantifiziert. Dabei konnte CEACAM1 in 33 von 46 (72 %) Melanomzelllinien detektiert werden, wobei CEACAM1-4L die höchste Abundanz aufwies (Tabelle 4). Weiterhin zu erwähnen ist, dass in allen analysierten Zelllinien die L-Varianten stets stärker exprimiert wurden als die korrespondierenden S-Varianten. Zudem wurde eine stärkere Expression der Varianten CEACAM1-4L und CEACAM1-4S verglichen zu den CEACAM1-3 Varianten detektiert (Tabelle 4).

Basierend auf den unterschiedlichen Passagenanzahlen, resultierend durch die verschiedenen Kultivierungszeiträume, lassen sich die in Tabelle 4 aufgelisteten Melanomzelllinien in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe zeichnet sich durch niedrige Passagenzahlen (Passagen <10) aus, wohingegen die Zellen der zweiten Gruppe höhere Passagenzahlen (Passagen >30) aufwiesen. Alle Zelllinien mit dem Namen „UKE-Mel“ wurden weniger als 10 mal passagiert, während alle Zelllinien mit der Bezeichnung „Ma-Mel“, sowie die Zelllinien A375 und UKRV-Mel-15a zwischen 30 und 120-mal passagiert wurden. Es zeigte sich, dass die Stärke der Expression von CEACAM1-3S ($p=0,0132$) und CEACAM1-3L ($p=0,0005$) mit der Anzahl an Passagen korrelierend ansteigt (Abbildung 5).

Tabelle 4: Expression der CEACAM1 Spleißvarianten in Melanomzelllinien

Für die Expressionsanalyse wurden die Intensitäten semi-quantitativer RT-PCR Banden densitometrisch mittels ImageJ Software quantifiziert.

Weiß: keine Expression; Hellgrau: geringe Expression [≤ 25 mittlere Pixelintensität]; Dunkelgrau: Mittlere Expressionsstärke [≤ 85 mittlere Pixelintensität]; Schwarz: Hohe Expression [≥ 85 mittlere Pixelintensität]

Zelllinie	CEACAM1-3S	CEACAM1-3L	CEACAM1-4S	CEACAM1-4L	Lokalisation der Metastase
A375					Haut
Ma-Mel-8bIV					Haut
Ma-Mel-16					Intestinal
Ma-Mel-37a					Lymphknoten
Ma-Mel-45a					Gehirn
Ma-Mel-48a					Haut
Ma-Mel-48b					Lymphknoten
Ma-Mel-57					Lymphknoten
Ma-Mel-63a					Haut
Ma-Mel-65					Lymphknoten
Ma-Mel-66b					Haut
Ma-Mel-86a					Lymphknoten
Ma-Mel-86b					Lymphknoten
Ma-Mel-86c					Lymphknoten
Ma-Mel-94					Lymphknoten
Ma-Mel-114					Gehirn
Ma-Mel-142a					Vagina
Ma-Mel-174a					Lymphknoten
UKE-Mel-1a					Lymphknoten
UKE-Mel-2a					Aszites
UKE-Mel-3a					Haut
UKE-Mel-4a					Haut
UKE-Mel-5a					Haut
UKE-Mel-6a					Haut
UKE-Mel-7b					Haut
UKE-Mel-7g					Haut
UKE-Mel-8a					Haut
UKE-Mel-9a					Haut
UKE-Mel-10a					Haut
UKE-Mel-11a					Haut
UKE-Mel-14a					Haut
UKE-Mel-14b					Haut
UKE-Mel-15a					Haut
UKE-Mel-16a					Knochen
UKE-Mel-18a					Lymphknoten
UKE-Mel-19a					Haut
UKE-Mel-20a					Haut
UKE-Mel-21a					Lymphknoten
UKE-Mel-22a					Haut
UKE-Mel-23a					Haut
UKE-Mel-24a					Haut
UKE-Mel-26a					Lymphknoten
UKE-Mel-27a					Haut
UKE-Mel-28a					Haut
UKE-Mel-29a					Bindehaut
UKRV-Mel-15a					Haut

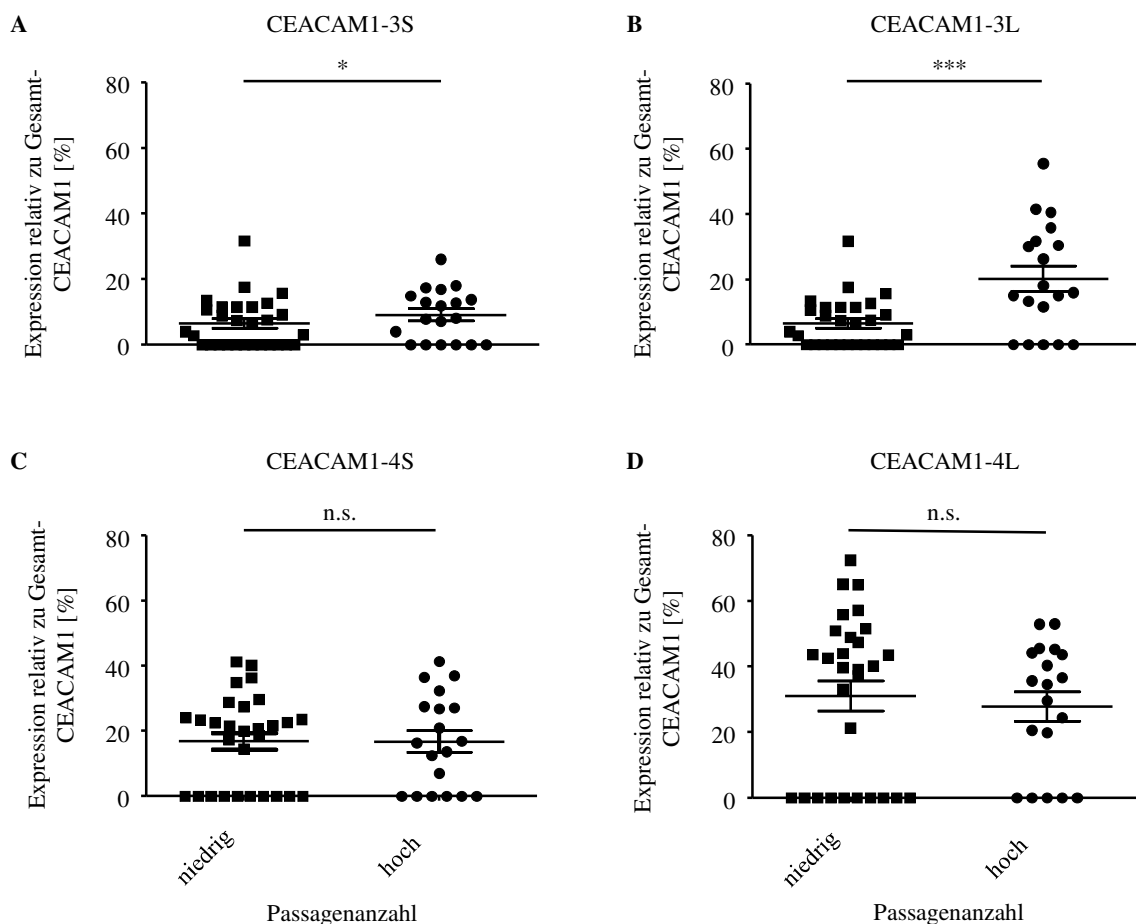


Abbildung 5: Die relative Expression der CEACAM1-3 Isoformen steigt mit der Passagenanzahl

Von (A) CEACAM1-3S, (B) CEACAM1-3L, (C) CEACAM1-4S und (D) CEACAM1-4L wurden die Expressionen relative zu Gesamt-CEACAM1 mittels semi-quantitativer RT-PCR ermittelt. Hierbei wurden Zelllinien, welche weniger als 10-mal (niedrig) oder mehr als 30-mal passagiert (hoch) wurden mittels Student's t-Test statistisch verglichen. n.s., nicht signifikant; * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

Um die klinische Relevanz der einzelnen CEACAM1 Spleißvarianten im malignen Melanom besser zu verstehen, wurden 51 Tumorbiopsien von Melanompatienten aus unterschiedlichen klinischen Stadien (nach AJCC Kriterien, (3), Tabelle 5) auf ihre CEACAM1 Isoformenexpression untersucht. Hierbei wurden in 45 (88%) der 51 analysierten Biopsien eine CEACAM1 Expression nachgewiesen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Expression der CEACAM1 Isoformen in Biopsien von Melanompatienten und korrespondierende Patientencharakteristika

Abkürzungen: y, Jahre; mm, Millimeter; N, Anzahl

		Biopsien positiv für die jeweiligen CEACAM1 Isoformen			
	Total (N=51)	CEACAM1-3S (N=26)	CEACAM1-3L (N=38)	CEACAM1-4S (N=40)	CEACAM1-4L (N=45)
Alter bei Exzision [y]					
Mittelwert	62	62	59	60	61
Verteilung	34-90	34 - 85	34 - 85	34 - 90	34 - 90
Geschlecht					
Männlich	28	13	20	22	24
Weiblich	23	13	18	18	21
Klinisches Stadium ^a					
Stadium I / II	8	0	1	4	4
Stadium III	21	8	17	17	20
Stadium IV	22	18	20	19	21
Breslow Tiefe [mm]					
pT1 (≤ 1.00)	9	3	3	4	5
pT2 (1.01 - 2.00)	13	10	11	11	13
pT3 (2.01 - 4.00)	14	6	12	12	12
pT4 (> 4.00)	9	5	7	8	9
unbekannt	6	2	5	5	6
Lokalisation					
Haut	42	21	30	33	36
Andere	9	5	8	7	9
Ulzeration					
Ja	18	7	13	15	17
Nein	13	10	11	10	11
unbekannt	20	9	14	15	17

^a entsprechend den AJCC Kriterien von 2010

In lediglich einer der fünf analysierten Biopsien von Stadium I Patienten konnte CEACAM1-4L und CEACAM1-4S detektiert werden, während die restlichen vier Biopsien keine CEACAM1 Expression zeigten (Tabelle 6). Die längste Isoform, CEACAM1-4L zeigte die höchste Abundanz aller Isoformen (88%), sie konnte in allen CEACAM1-positiven Biopsien nachgewiesen werden. Hingegen konnte in lediglich einer Biopsie eines primären Melanoms (Stadium II) CEACAM1-3L, jedoch in keiner dieser Biopsien CEACAM1-3S nachgewiesen werden (Tabelle 6).

Wie in Abbildung 6 A dargestellt, konnte eine Korrelation zwischen der Expression der CEACAM1-3 Isoformen und der Tumorprogression nachgewiesen werden. Mit steigendem klinischen Stadium der Melanompatienten konnte ein signifikanter Anstieg in den Expressionen der Isoformen CEACAM1-3L (Stadium III, $p=0,002$; Stadium IV, $p<0,0001$ verglichen mit Stadium I/II) und CEACAM1-3S (CEACAM1-3S: Stadium III, $p=0,031$; Stadium IV, $p=0$, verglichen mit Stadium I/II) detektiert werden (Abbildung 6 A). Die stärksten Expressionsintensitäten der CEACAM1-3 Isoformen zeigten sich bei der Analyse der Biopsien von Stadium IV Patienten. Ein Anstieg der Expressionsintensität während der Progression von Stadium I/II zu Stadium III ($p=0,030$) zeigte sich für die Isoform CEACAM1-4L (Abbildung 6 A). Im Gegensatz dazu konnte eine solche Korrelation zwischen Tumorprogression und Expression von CEACAM1-4S nicht nachgewiesen werden.

Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass die verschiedenen Verhältnisse von CEACAM1-S zu CEACAM1-L (S:L) in Zellen einen Einfluss auf die Signalübertragung ausgehend von CEACAM1 haben (100;101;122;148). Basierend auf diesen Daten wurde im Weiteren untersucht, ob sich dieses Verhältnis auch in den hier analysierten Melanombiopsien unterscheidet. Hierbei zeigte sich in den fortgeschrittenen Stadien (III und IV) ein geringes CEACAM1-4 S:L-Verhältnis, verglichen mit den Biopsien von Stadium I/II Patienten, wobei kein Unterschied zwischen Stadium III und IV detektiert werden konnte (Abbildung 6 B). Bei den Untersuchungen der CEACAM1-3 S:L-Verhältnisse zeigte sich, dass mit steigendem Stadium auch das S:L-Verhältnis dieser Isoformen anstieg (Abbildung 6 B). Das CEACAM1-3 S:L Verhältnis konnte in Biopsien von Stadium I/II Patienten jedoch nicht ermittelt werden, da primäre Biopsien kein CEACAM1-3S bzw. lediglich eine Biopsie CEACAM1-3L exprimierte (Tabelle 6).

Tabelle 6: Quantitative Expressionsanalysen der CEACAM1 Isoformenexpression in humanen Melanombiopsien

Aufgelistet sind die Expressionen von CEACAM1-3S, CEACAM1-3L, CEACAM1-4S und CEACAM1-4L relative zu Gesamt-CEACAM1 in 8 Biopsien des Stadium I/II, 21 Biopsien des Stadium III und 22 Biopsien des Stadium IV. Die Bestimmung der Pixel-Intensitäten der RT-PCR Banden erfolgte mittels ImageJ Software.

Expression relativ zu Gesamt-CEACAM1 [%]					
Patient	AJCC Stadium	CEACAM1-3S	CEACAM1-3L	CEACAM1-4S	CEACAM1-4L
1	I	0,0	0,0	55,3	44,7
2	I	0,0	0,0	0,0	0,0
3	I	0,0	0,0	0,0	0,0
4	I	0,0	0,0	0,0	0,0
5	I	0,0	0,0	0,0	0,0
6	II	0,0	0,0	30,4	69,6
7	II	0,0	0,0	57,3	42,7
8	II	0,0	12,3	29,7	58,0
9	III	0,0	10,4	24,7	64,9
10	III	0,0	15,6	31,6	52,8
11	III	0,0	15,4	25,6	59,1
12	III	0,0	27,0	18,8	54,2
13	III	0,0	0,0	0,0	100,0
14	III	0,0	0,0	59,8	40,2
15	III	0,0	19,8	26,4	53,8
16	III	0,0	0,0	0,0	100,0
17	III	0,0	10,7	26,7	62,6
18	III	0,0	5,3	29,9	64,8
19	III	0,0	0,0	0,0	0,0
20	III	0,0	3,7	32,3	64,0
21	III	0,0	14,4	0,0	85,6
22	III	0,0	8,6	25,7	65,6
23	III	0,5	23,2	18,5	57,8
24	III	1,4	8,8	36,3	53,5
25	III	2,2	10,6	31,8	55,4
26	III	4,4	14,4	36,9	44,3
27	III	6,7	15,8	29,1	48,2
28	III	6,8	7,3	42,1	43,7
29	III	11,9	18,0	34,9	35,2
30	IV	0,0	12,5	28,6	56,8
31	IV	0,0	3,5	24,0	72,5
32	IV	0,0	21,1	0,0	78,9
33	IV	0,0	0,0	0,0	0,0
34	IV	0,6	0,0	37,5	62,5
35	IV	0,7	27,5	35,9	36,0
36	IV	2,1	20,2	16,9	60,7
37	IV	2,1	36,1	0,0	63,2
38	IV	2,6	22,2	25,0	50,2
39	IV	2,8	18,5	23,5	55,2
40	IV	3,3	9,4	41,5	45,9
41	IV	3,4	19,7	24,9	52,0
42	IV	3,4	27,8	14,9	53,9
43	IV	3,4	30,4	17,7	48,5
44	IV	5,1	21,7	28,9	44,3
45	IV	5,5	22,7	17,9	53,9
46	IV	5,9	12,6	38,0	43,4
47	IV	6,4	14,0	31,7	47,8
48	IV	6,6	24,4	17,5	51,6
49	IV	11,2	10,5	27,0	51,4
50	IV	12,1	27,2	27,9	32,8
51	IV	16,8	13,8	34,6	34,8

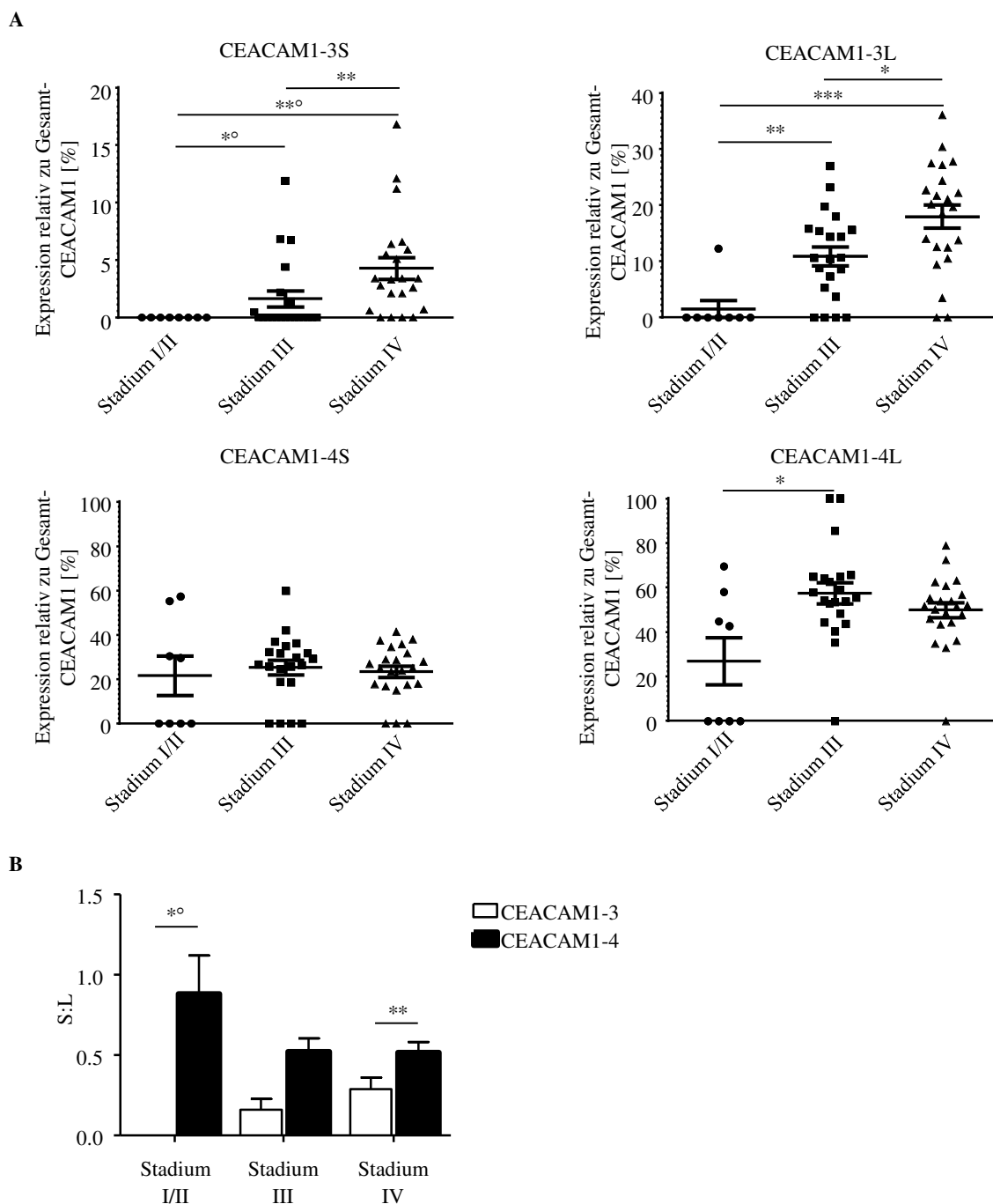


Abbildung 6: CEACAM1-3 Expression korreliert mit dem klinischen Stadium, wobei eine erhöhte CEACAM1-3S Expression mit einer besseren Prognose korreliert

(A) Streudiagramme verdeutlichen die relative Expression der CEACAM1 Isoformen in Melanombiopsien relativ zur Gesamt-CEACAM1 Expression. Die Biopsien wurden nach dem klinischen Stadium der korrespondierenden Patienten gruppiert (Stadium I/II, N=8; Stadium III, N=21, Stadium IV, N=22). Jeder Datenpunkt spiegelt eine Biopsie wieder. (B) Dargestellt sind die Verhältnisse der S-Varianten zu den korrespondierenden L-Varianten in Biopsien aus Melanompatienten verschiedener Stadien. Stadium I/II: CEACAM1-3 = 0 Biopsien, CEACAM1-4 = 4 Biopsien; Stadium III: CEACAM1-3 = 17 Biopsien, CEACAM1-4 = 20 Biopsien; Stadium IV: CEACAM1-3 = 20 Biopsien, CEACAM1-4 = 21 Biopsien. Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts. Signifikanzen wurden mittels Zweistichproben t-Test berechnet; außer bei Gruppe ohne Standardfehler, dann wurde der Einstichproben t-Test angewendet (°). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

Überlebensanalysen der Melanompatienten zeigten unerwarteter Weise, dass Patienten mit CEACAM1-3S exprimierenden Melanomen ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben ($p=0,039$), im Vergleich zu Patienten mit CEACAM1-3S negativen Tumoren, aufwiesen (Risikoquotient: 0,43; 95 % Konfidenzintervall [0,19 ... 0,98]). Für die Isoformen CEACAM1-3L, CEACAM1-4L und CEACAM1-4S konnte keine Korrelation zwischen der Isoformenexpression und dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Abbildung 7). Bei der Durchführung der hier gezeigten Analysen wurde kein Schwellenwert gesetzt, sondern Patienten deren Biopsien die jeweilige Isoform exprimierten wurden mit Patienten verglichen, deren Biopsien die jeweilige Isoform nicht exprimierten.

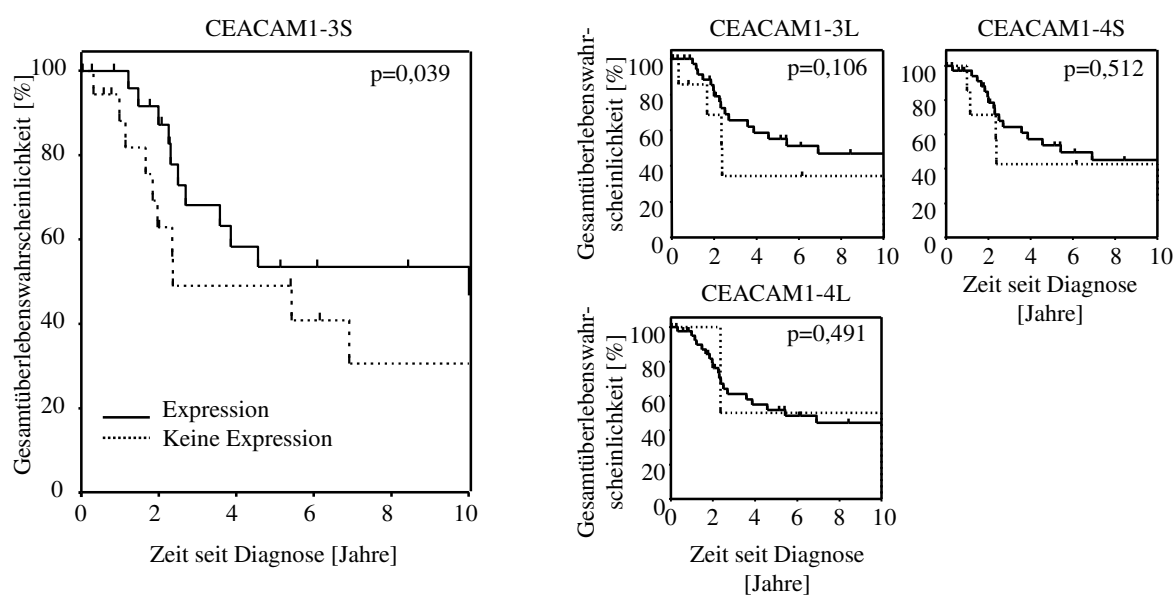


Abbildung 7: Die Expression von CEACAM1-3S im malignen Melanom korreliert mit einem verlängerten Gesamtüberleben der Patienten

Kaplan-Meier Kurven der Patienten ($N=51$), deren Melanombiopsien die jeweilig gekennzeichnet CEACAM1 Isoform exprimierten (durchgezogene Linie) vs. Patienten mit CEACAM1 Isoform negativen Tumoren (gestrichelte Linie). Kurze vertikale Striche repräsentieren zensierte Ereignisse. Signifikanzen wurden mittels Log-Rank Test berechnet. CEACAM1-3S: ohne Expression $N=26$, mit Expression $N=25$; CEACAM1-3L: ohne Expression $N=13$, mit Expression $N=38$; CEACAM1-4S: ohne Expression $N=11$, mit Expression $N=40$; CEACAM1-4L: ohne Expression $N=6$, mit Expression $N=45$

5.2. Etablierung von CEACAM1-Isoform exprimierenden Melanomzelllinien

Zur Analyse der zellbiologischen Funktion jeder einzelnen CEACAM1 Isoform wurde die Zelllinie Ma-Mel-86a, welche endogen kein CEACAM1 exprimiert, mit Expressionsplasmiden für CEACAM1-3S, CEACAM1-3L, CEACAM1-4S, CEACAM1-4L und dem korrespondierenden Leervektor transfiziert.

Es wurden von jeder Transfektante drei Einzelzellklone etabliert, (Abbildung 8 zeigt ein repräsentatives Set von Klonen). Die etablierten Klone wurden mittels RT-PCR (Abbildung 8A) und Western Blot (Abbildung 8B) auf die Expression der einzelnen Isoformen getestet. Die unterschiedlichen Größen der PCR-Fragmente bzw. der Proteine (Abbildung 8 A und B) sind auf das Fehlen bzw. Vorhandensein der A2-Domäne, sowie die unterschiedlichen Längen der intrazellulären Domäne, zurückzuführen. Weiterhin zeigen diese Resultate, dass die ektopische Expression von CEACAM1 nicht zu einer Induktion von endogenem CEACAM1 führt (Abbildung 8). Da CEACAM1 ein Zell-Zelladhäsionsmolekül ist, welches folgend auf Zelloberflächen exprimiert wird, wurde zusätzlich die Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometer bestimmt (Abbildung 8C). Hierbei zeigten sich die höchsten MFI (mittlere Fluoreszenzintensität; „*mean fluorescence intensity*“) Werte für die Isoformen CEACAM1-4L (638) und CEACAM1-4S (615), der niedrigste MFI Wert wurden bei der Analyse der CEACAM1-3S (192) transfizierten Zellen detektiert. Diese neu etablierten Zelllinien wurden in den weiteren zellbiologischen und immunologischen Experimenten verwendet, um so die biologische Funktion der CEACAM1 Isoformen im malignen Melanom zu analysieren.

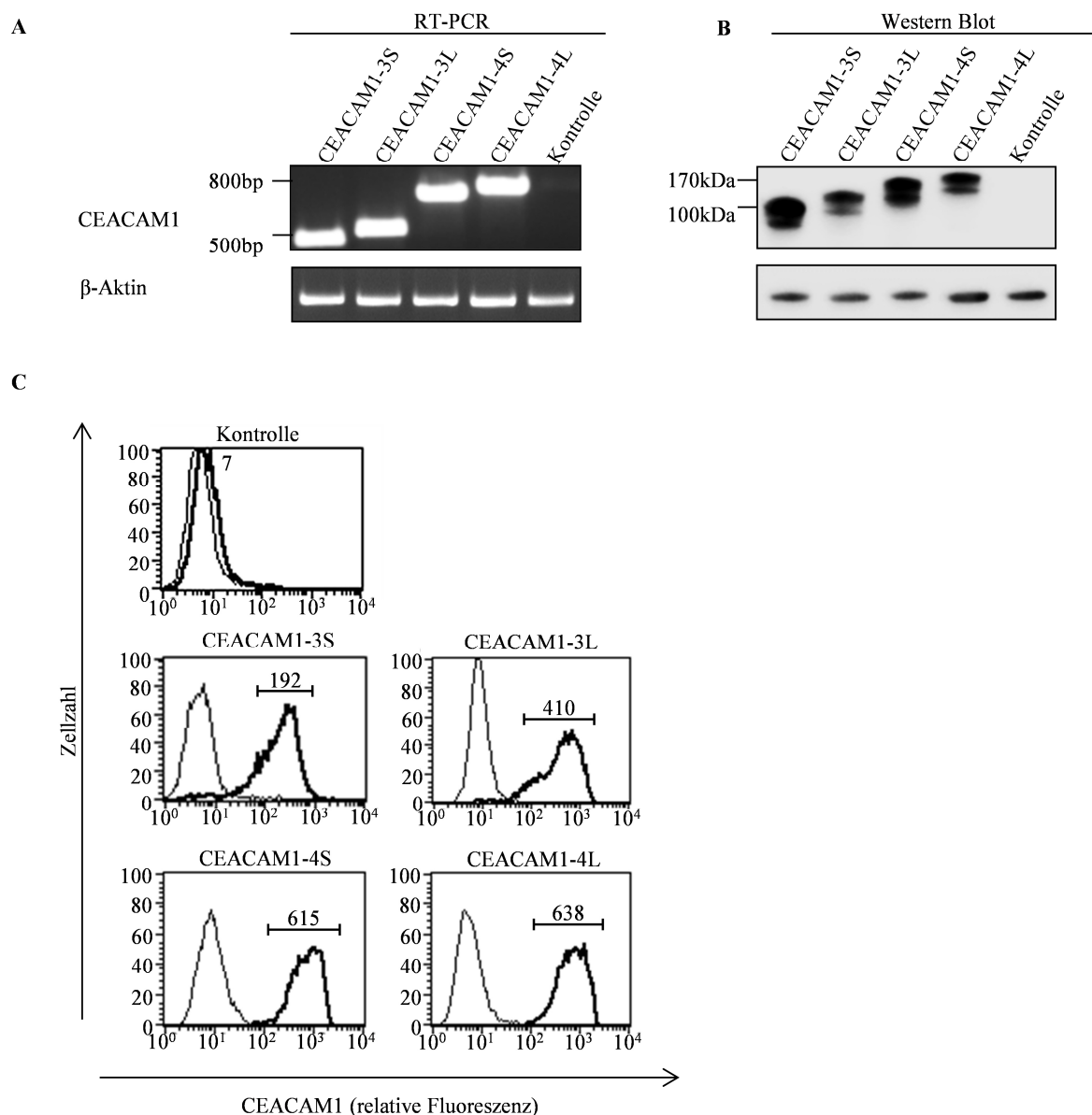


Abbildung 8: CEACAM1-Transfektanten der Zelllinie Ma-Mel-86a zeigen distinkte Expression der einzelnen Isoformen.

(A) Die Expressionsvektoren mit den jeweiligen CEACAM1 Spleißvarianten und der Leervektor wurden stabil in Zellen der Linie Ma-Mel-86a transfiziert und anschließend Einzelklone generiert. Die Expression der einzelnen Isoformen wurde mittels RT-PCR analysiert. Die unterschiedlichen Fragmente bzw. Proteingrößen können mit dem Verlust der A2-Domäne (CEACAM1-3 Varianten) und der unterschiedlichen Länge der intrazellulären Domäne (CEACAM1-L/S) erklärt werden. Aufgrund der verwendeten Primer (siehe Abbildung 4) entstehen folgende Fragmentgrößen: CEACAM1-4L=779bp; CEACAM1-4S=726bp; CEACAM1-3L=491bp; CEACAM1-3S=438bp. (B) Gezeigt sind Expressionsanalysen der Transfektanten auf Proteinebene mittels Western Blot. Als Kontrollzellen fungierten Leervektor-transfizierte Ma-Mel-86a Zellen. Beta-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (C) Die CEACAM1 Oberflächenexpression in den Transfektanten wurde mittels Durchflusszytometer evaluiert. Die Zellen wurden mit Antikörpern spezifisch für Gesamt-CEACAM1 (dicke Linie, mAK 4/3/17) und einer Isotypen-Kontrolle (dünne Linie) markiert. Die Zahlen geben den gemessenen MFI-Wert (*mean fluorescent intensity*) an. Es sind jeweils repräsentative Experimente aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit gleichem Ergebnis gezeigt.

5.3. CEACAM1 Isoformen weisen unterschiedliche zelluläre Lokalisationen in Melanomzellen auf

Es wurde bereits durch Sadekova et al. in Mauszellen beschrieben, dass vor allem die CEACAM1 Isoformen, welche eine lange zytoplasmatische Domäne besitzen, sich an Zell-Zell-Interaktionsstellen ansammeln. Diese Akkumulation wird durch die Aktivität von Rho-GTPasen vermittelt und spielt eine wichtige Rolle für die zelluläre Funktion von CEACAM1 (122). Allerdings existieren bisher keine Studien, welche die zellulären Lokalisationen der einzelnen CEACAM1-Isoformen analysieren. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die CEACAM1 Lokalisation in den oben charakterisierten Transfektanten mittels Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 9).

Hierbei zeigte sich, dass in den Transfektanten CEACAM1-3L und CEACAM1-3S vor allem in zytoplasmatischen, vesikulären Strukturen lokalisiert (Abbildung 9A I und II, Pfeile), jedoch nur zu einem geringen Teil auf der Zelloberfläche (Abbildung 9 A I und II, Pfeilspitzen) präsentiert waren. Diese vesikulären Strukturen akkumulieren um den Zellkern. Ausgehend von diesen Akkumulaten wurden Perlschnurartige Strukturen detektiert. Diese Strukturen aus CEACAM1 positiven Vesikeln wiesen stets Richtung Zell-Zell-Kontaktseiten (Abbildung 9 A I und II, Pfeile) und können als Indiz für eine gezielte Rekrutierung der CEACAM1-positiven Vesikeln zu diesen Zell-Zellinteraktionspunkten interpretiert werden. Doppelfärbungen für F-Aktin (Aktinfilamente) und CEACAM1 (Abbildung 9 B) zeigten, dass die CEACAM1 positiven Vesikel in diesen perlschnurartigen Strukturen an Aktinfilamente assoziiert sind (Abbildung 9 B, Pfeile). Diese Beobachtung konnte sowohl in CEACAM1-3S (Abbildung 9 B) als auch in CEACAM1-3L (Daten nicht gezeigt) Transfektanten nachgewiesen werden. In CEACAM1-4L und CEACAM1-4S Klonen konnte lediglich eine Zelloberflächen-Lokalisation für CEACAM1 nachgewiesen werden (Abbildung 9 A III und IV). Interessanterweise waren bei diesen Transfektanten die Färbungen an Zell-Zellkontaktpunkten ebenfalls intensiver als an Stellen, an denen die Zellen keine Kontakte zu Nachbarzellen einnehmen (Abbildung 9A III und IV, Pfeilspitzen). In den Kontrollzellen konnte, wie zu erwarten war, kein CEACAM1 detektiert werden.

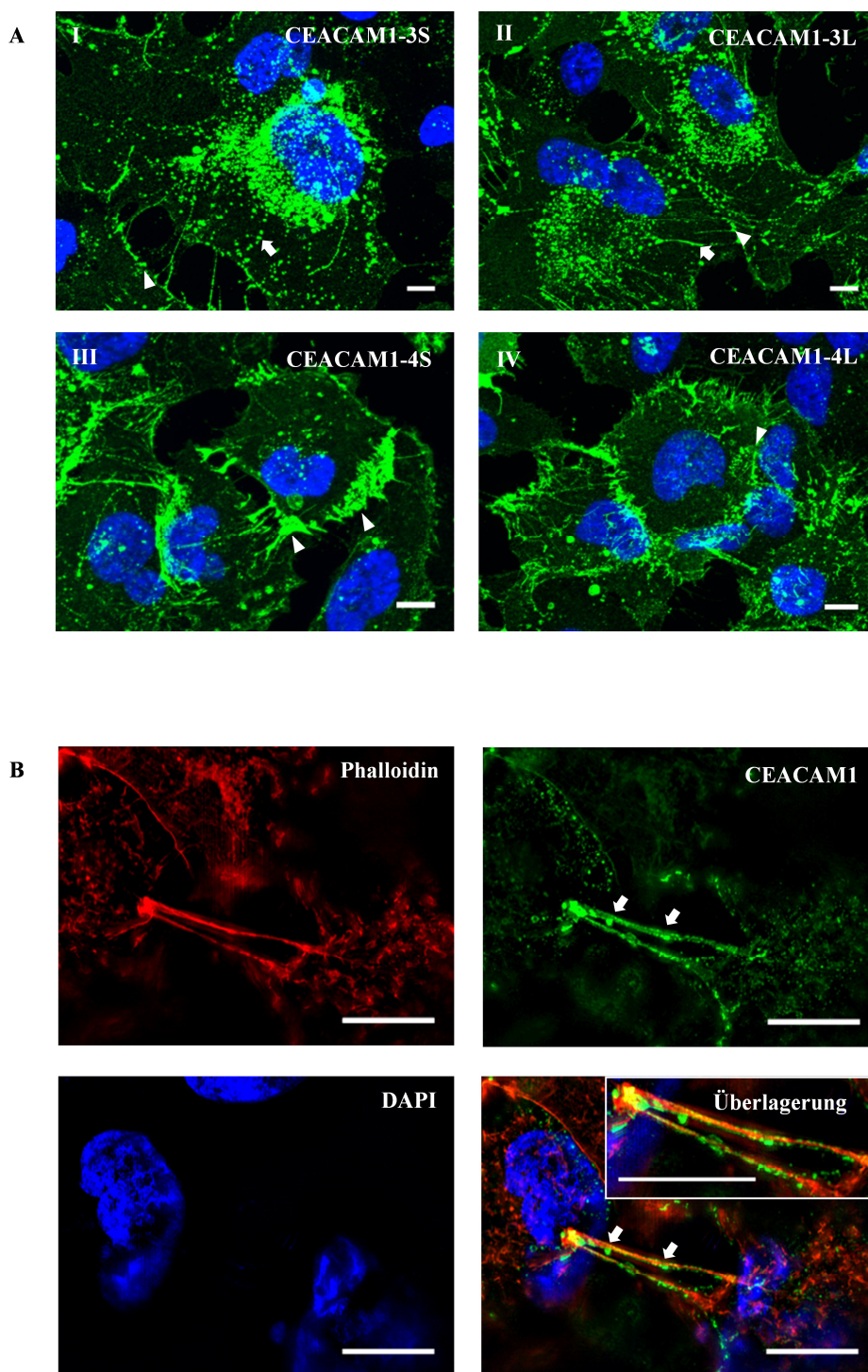


Abbildung 9: CEACAM1 Isoformen weisen unterschiedliche zelluläre Lokalisationen in Melanomzellen auf

(A) Die zelluläre Lokalisation der CEACAM1 Isoformen wurde mittels Immunfluoreszenz in den CEACAM1 Transfektanten analysiert. Hierzu wurde Gesamt-CEACAM1 mit dem Antikörper 4/3/17 gefärbt (grün) und die Zellkerne mit Hoechst DAPI (blau) gegengefärbt. Weiße Pfeilspitzen; CEACAM1 lokalisiert an Zell-Zell-Kontakten, Weiße Pfeile; CEACAM1 positive Vesikel wie eine Perlenschnur angeordnet, weisen in Richtung Zell-Zell-Interaktionspunkten. (B) Doppelfärbung der CEACAM1-3S Transfektanten mit Phalloidin (F-Aktin, rot) und mAk 4/3/17 (CEACAM1, grün), die Zellkerne wurden mit Hoechst DAPI gegengefärbt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Doppelfärbung der CEACAM1-3L Klone erzielt. Gezeigt sind die Maximum-Z-Projektionen von repräsentativen konfokalen Aufnahmen. Diese Färbungen wurden drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Messbalken, 10µm

5.4. Einfluss der CEACAM1 Isoformen auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Melanomzellen

Bereits 2004 konnte von Ebrahimnejad et al. gezeigt werden, dass das migratorische und invasive Potential von Melanomzellen durch die Expression von CEACAM1-4L gesteigert werden kann (32). Des Weiteren wies Thies et al. nach, dass die CEACAM1 Expression in primären Melanomen mit einer gesteigerten Metastasierungsrate einhergeht (152). Jedoch existiert bisher keine umfassende Studie über die Einflüsse der unterschiedlichen CEACAM1 Isoformen auf die Zellmotilität von Melanomzellen bzw. von anderen malignen Zellen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Einfluss der einzelnen CEACAM1 Spleißvarianten auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Melanomzellen mittels xCELLigence System bestimmt.

Es zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen, dass die CEACAM1-4S ($p=0,009$) und CEACAM1-4L ($p=0,025$) Transfektanten signifikante Steigerungen im migratorischen Potential der Ma-Mel-86a Zelllinie bewirkten (Abbildung 10 A+B). CEACAM1-3L Transfektanten zeigten ebenfalls ein signifikant gesteigertes Migrationspotential ($p=0,023$), allerdings war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt als bei den CEACAM1-4 Varianten (Abbildung 10 A+B). Ein ähnlicher Trend ergab sich, bei der Analyse des Invasionsverhaltens dieser Zellen. Hierbei zeigten die CEACAM1-4S ($p=0,006$) und CEACAM1-4L ($p=0,005$) Transfektanten die höchsten Invasionspotentiale im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Expression von ektopischen CEACAM1-3L zeigte jedoch keinen signifikanten Effekt auf das Invasionsverhalten der Zelllinie Ma-Mel-86a (Abbildung 10 C+D). Interessanterweise zeigten ausschließlich Melanomzellen transfiziert mit CEACAM1-3S einen gegenteiligen Effekt. Detektiert wurde sowohl eine signifikant verminderte Migration ($p=0,031$, Abbildung 10 A+B) als auch ein stark verringertes Invasionspotential ($p=0,020$, Abbildung 10 C+D), im Vergleich zu den Kontrollzellen. Um klonale Effekte ausschließen zu können, wurde ein zweites Set an Ma-Mel-86a Einzelzellklonen, welche unabhängig vom ersten Set generiert wurden, analysiert. Bei den Analysen dieser Transfektanten zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

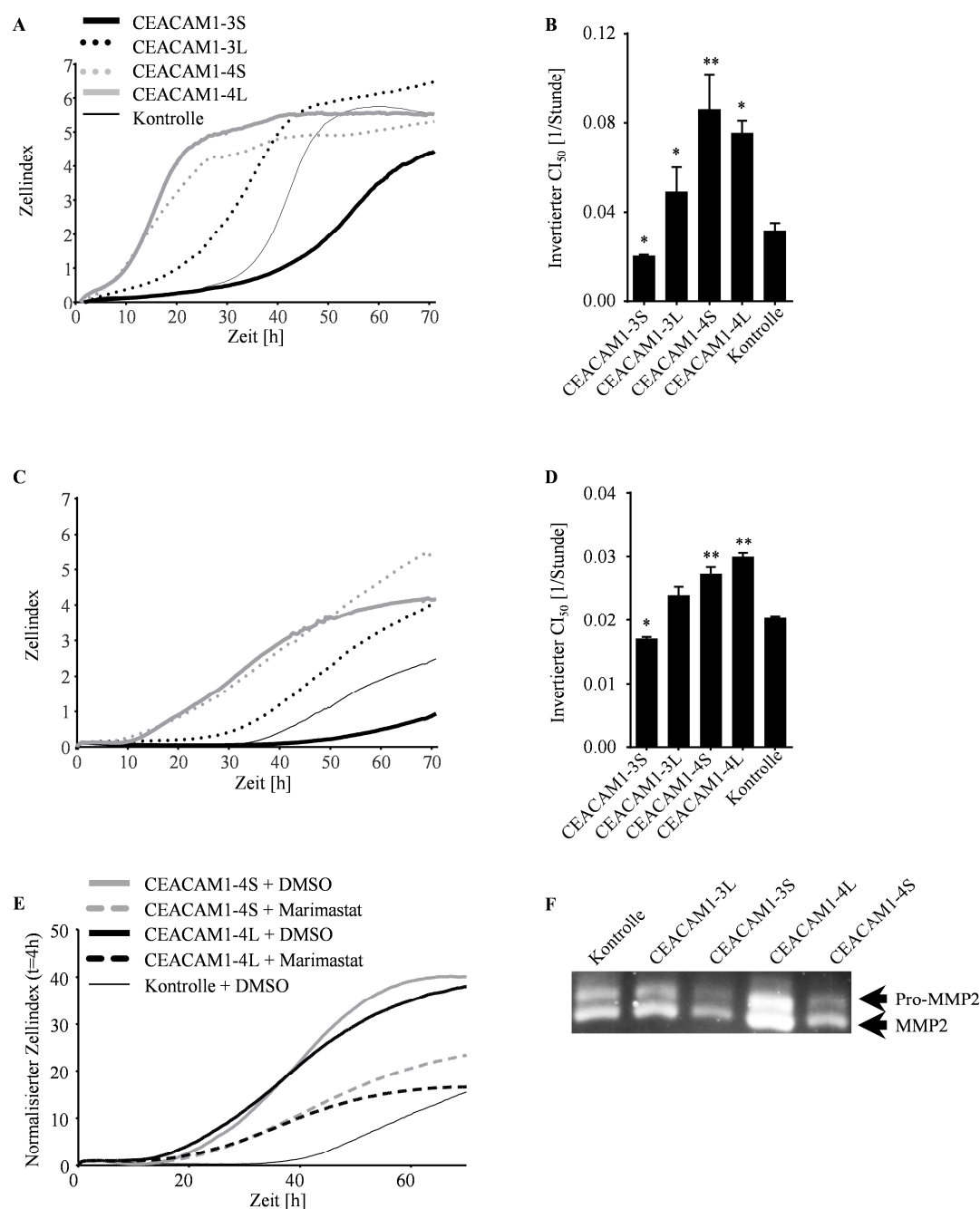


Abbildung 10: CEACAM1 Isoformen beeinflussen unterschiedlich die Zellmotilität von Melanomzellen

Mittels xCELLigence Systems wurde das Migrations- (A+B) und Invasionspotential (C+D) der CEACAM1 Transfektanten analysiert. Alle Experimente wurden in Triplikaten dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, ein repräsentatives Experiment ist dargestellt. Für die statistische Auswertung (B+D) wurde der halbmaximale Zellindex (CI_{50}) im Bereich von 0-70 Stunden verwendet, diese Werte der Transfektanten wurden mittels Student's t-Test statistisch mit den Kontrollzellen verglichen. Die invertierten Werte von drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts (E) Das Invasionspotential der CEACAM1-4 Transfektanten wurde nach Zugabe von 0,1 mM Marimastat bzw. DMSO analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten ist aufgezeigt. (F) Bestimmung der MMP-2 Aktivität in konditionierten Zellkulturüberständen der CEACAM1 Transfektanten mittels Gelatine-Zymographie. Volumen der analysierten Überstände wurden auf die Zellzahl normalisiert. Ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Da Matrix-Metalloproteasen (MMPs) eine essentielle Rolle für die Invasionsfähigkeit von malignen Zellen spielen (144), wurde die Bedeutung dieser für den invasionssteigernden Effekt der CEACAM1-4L und CEACAM1-4S Variante analysiert. Zu diesem Zweck wurden die korrespondierenden Transfektanten mit Marimastat behandelt, dieser Breitband MMP-Inhibitor hemmt spezifisch auf die Matrix-Metalloproteasen -1, -2, -7, -9 und -14. Wie in Abbildung 10 E gezeigt, verringerte die Marimastat Behandlung den invasionssteigernden Effekt der CEACAM1-4 Isoformen. Der frühere Invasionstart der CEACAM1-4

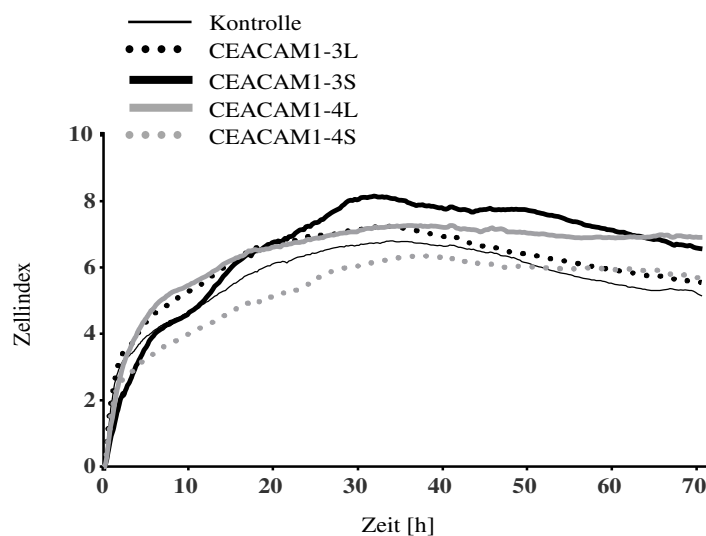


Abbildung 11: CEACAM1 Isoformen haben keinen Einfluss auf die Proliferation von Melanomzellen

Das Proliferationsvermögen der CEACAM1 Transfektanten wurde mittels xCELLigence System analysiert.

xCELLigence System analysiert. Hierbei zeigte sich kein Unterschied im Proliferationsverhalten der Transfektanten (Abbildung 11).

5.5. CEACAM1-4L verbessert das matrixunabhängige Wachstum von Melanomzellen

Die Fähigkeit matrixunabhängig zu wachsen ist eine fundamentale Eigenschaft maligner Zellen (99). Es ist bereits bekannt, dass dieses Merkmal neo-transformierter Zellen mit der Aggressivität *in vivo* korreliert (24;99;135). Ein erhöhtes Potential unabhängig von einer Matrix zu proliferieren, was bedeutet ohne Adhäsion an einen Untergrund, ist mit einer erhöhten Tumorigenität und einem höheren Potential Metastasen zu generieren verbunden (24;99;135). Wenn gesunde Zellen, insbesondere Epithelzellen, den Kontakt zur Matrix verlieren, gehen sie in eine Art Apoptose, die sogenannte Anoikis (43), was jedoch bei malignen Zellen nicht der Fall ist. Um zu testen, ob die Expression der CEACAM1 Isoformen

Transfektanten, im Vergleich zu den Kontrollzellen, konnte jedoch durch die Marimastatbehandlung nicht verzögert werden. Im Weiteren konnte eine erhöhte MMP-2 Aktivität in den CEACAM1-4L Transfektanten nachgewiesen werden.

Außerdem wurde das proliferative Verhalten der CEACAM1 Isoform-Transfektanten mittels

einen Einfluss auf die Tumorigenität von Melanomzellen haben, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit das Potential der CEACAM1 Transfektanten matrixunabhängig zu wachsen, mittels Soft-Agar Kolonie-Assay (siehe Punkt 4.2.3.4) analysiert.

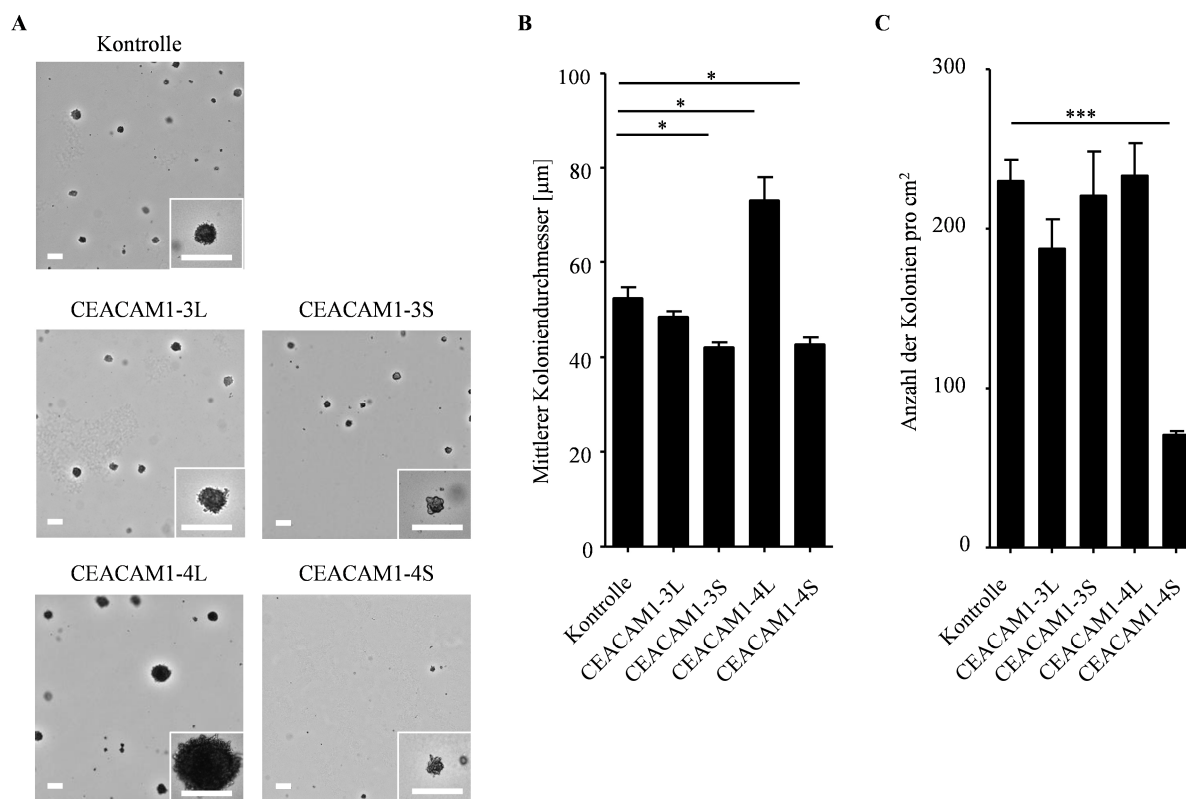


Abbildung 12: CEACAM1-4L erhöht das Potential von Melanomzellen ohne Kontakt zu einer Matrix zu wachsen

Es wurde die Fähigkeit der CEACAM1 Transfektanten unabhängig von einem Substrat zu wachsen mittels Soft-Agar Kolonie-Assay analysiert. (A) Repräsentative Kolonien aus drei unabhängigen Experimenten. Messbalken, 100µm (B) Mittlerer Durchmesser der im Softagar gebildeten Kolonien. (C) Anzahl der Kolonien pro Quadratzentimeter. Die Experimente wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, jedes Experiment wurde als Duplett angesetzt und die Zellen 14 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwertes

Hierbei konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den Kontrollzellen die CEACAM1-4L transfizierten Zellen nicht mehr Kolonien bildeten (Abbildung 12 A+C), jedoch erheblich größere Zellakkumulate im Softagar generierten (Abbildung 12 B, $p=0,0190$). Des Weiteren formten CEACAM1-3S ($p=0,0160$) und CEACAM1-4S ($p=0,0251$) Transfektanten signifikant kleinere Kolonien (Abbildung 12 B), allerdings wurde hierbei nur bei der CEACAM1-4S Transfektante eine deutlich geringere Kolonienanzahl als bei den Kontrollzellen detektiert (Abbildung 12 C, $p=0,0003$). Die Expression von exogenem CEACAM1-3L beeinflusst hierbei weder die Größe noch die Anzahl der Kolonien. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zellen transfiziert mit CEACAM1-3S/4S ein

geringeres matrixunabhängiges Wachstum verglichen mit den Kontrollzellen zeigen, während die CEACAM1-4L Transfektanten verstärkt ohne Kontakt zu einer Matrix wachsen können.

5.6. CEACAM1-Isoform spezifische Modulation der Oberflächenexpression von NK-Zell Liganden auf Melanomzellen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei CEACAM1 um ein multifunktionales Zelladhäsionsmolekül, dessen Isoformen die Motilität von Melanomzellen beeinflusst. Weiterhin wurde für CEACAM1 eine immunmodulatorische Funktion beschrieben (88;89;92). Hierbei konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 die Oberflächenexpression von Liganden auf Tumorzellen modulieren kann, welche von aktivierenden Rezeptoren (NKG2D) auf NK-Zellen erkannt werden. NKG2D ist auf fast allen NK-Zellen exprimiert und erkennt als Liganden MICA / MICB und ULBP-Moleküle (ULBP1-6) (97). Basierend auf diesen Daten wurden zunächst die Oberflächenexpressionen der NKG2D Liganden MICA und ULBP2 auf den CEACAM1 Isoform-Transfektanten mittels Durchflusszytometer evaluiert. Dabei konnten keine modulierenden Einflüsse von CEACAM1-3L und CEACAM1-4S auf die Oberflächenexpression von der NKG2DL nachgewiesen werden. Die Analyse der CEACAM1-3S Transfektante ergab eine erhöhte Oberflächenexpression von MICA ($p=0,006$) und ULBP2 ($p=0,011$). Hingegen wurde eine verringerte Expression von MICA ($p=0,020$) auf der Oberfläche der CEACAM1-4L Transfektante detektiert, jedoch keine Veränderung in der ULBP2 Expression (Abbildung 13 A+B). Die erhöhte Expression von MICA und ULBP2 auf der Oberfläche der CEACAM1-3S Transfektante konnte mittels Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden (Abbildung 13 C). Hierbei zeigte sich bei der Analyse der CEACAM1-3S transfizierten Zellen eine verstärkte Rekrutierung von MICA und ULBP2 Molekülen zur Zelloberfläche, was in Übereinstimmung zu den FACS Daten (Abbildung 13 A+B) steht. Des Weiteren wurde die Oberflächenexpression von ULBP3 und ULBP1 mittels Durchflusszytometer gemessen, wobei keine Expression dieser NKG2D Liganden auf den Ma-Mel-86a Zellen detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Neben dem NKG2D Rezeptor gibt es noch weitere, für die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen wichtige Rezeptor-Liganden Systeme (siehe 2.3.1). Aus diesem Grund wurden ebenfalls die Oberflächenexpressionen dieser Liganden bestimmt (Abbildung 13 D). Zunächst wurde die Oberflächenexpression von Liganden für den DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1) Rezeptor evaluiert. Hierzu wurden die MFI Werte von CD112 (Nectin-2) und CD155 (PVR, poliovirus receptor) gemessen, wobei die Expression von CD112 auf den Ma-Mel-86a Zellen im Vergleich zu CD155 sehr gering war (Abbildung

13 D). Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von CD155 auf den CEACAM1-3S Transfektanten ($p=0,0124$). Die durchflusszytometrische Analyse der CEACAM1-4L und CEACAM1-4S Transfektanten ergab hingegen eine verringerte CD155 (CEACAM1-4L, $p=0,0117$; CEACAM1-4S, $p=0,0442$) und CD112 (CEACAM1-4L, $p=0,0424$; CEACAM1-4S, $p=0,0169$) Expression auf der Oberfläche dieser Zellen (Abbildung 13 D).

Des Weiteren wurde die Oberflächenexpression der NCR Liganden (natural cytotoxicity receptors) gemessen. Zu den NCRs werden unter anderem die Rezeptoren NKp44 und NKp30 gezählt, diese Rezeptoren waren die ersten identifizierten, aktivierenden NK-Zellrezeptoren, doch sind ihre Liganden bisher noch nicht vollständig charakterisiert (129). Aus diesem Grund wurde für die Quantifizierung der NCR Liganden auf der Oberfläche der CEACAM1 Transfektanten entsprechende Rezeptor-Fc-Chimäre (siehe Punkt 4.1.7) verwendet. Es zeigte sich in den Ma-Mel-86a Zellen eine endogen sehr geringe bis keine Expression der Liganden dieser NCR Rezeptoren (MFI zwischen 1 und 1,8, Abbildung 13 D), nach Transfektion mit den CEACAM1-Isoformen konnte zudem keine signifikante Aberration in der Oberflächenexpression der NKp30 und NKp46 Liganden detektiert werden (Abbildung 13 D).

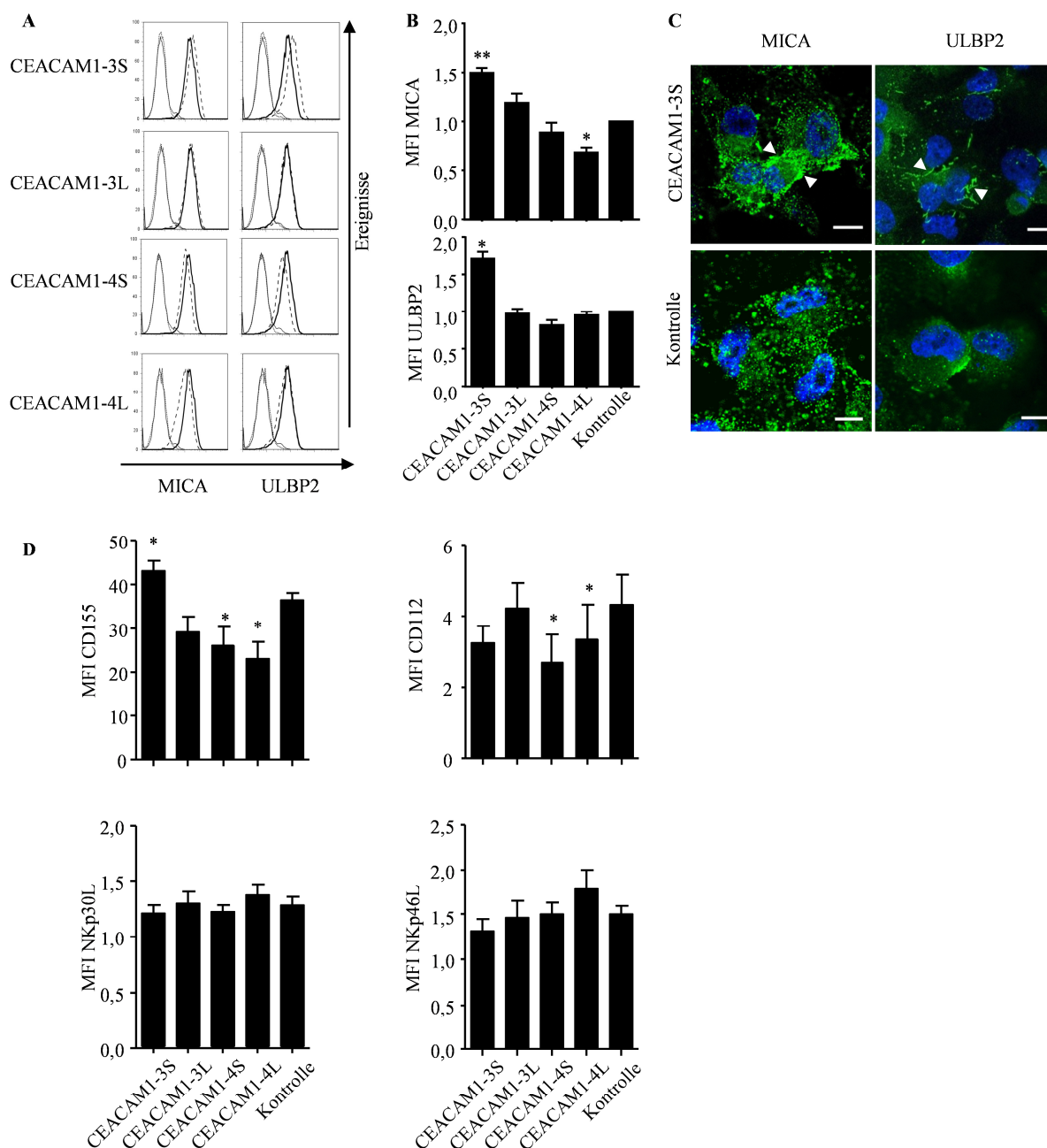


Abbildung 13: Ausschließlich CEACAM1-3S erhöht die Oberflächenexpression von NK-Zell spezifischen Liganden auf Melanomzellen

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Oberflächenexpressionen verschiedener Liganden für NK-Zellrezeptor der CEACAM1 Transfektanten evaluiert. **(A+B)** MICA und ULBP2 Oberflächenexpressionen von Kontrollzellen und CEACAM1Transfektanten wurden mittels Durchflusszytometrie verglichen. In **(A)** dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Histogramm.; Hintergrundexpression der Kontrollzellen (dünne schwarze Linie), Hintergrundexpression der jeweiligen Transfektante (dünne graue Linie), Expression des gekennzeichneten NKG2D Liganden der Kontrollzellen (dicke schwarze Linie) und Expression der jeweiligen Liganden in den CEACAM1 Transfektanten (gestrichelte schwarze Linie). **(B)** Mittlere MFI Werte von fünf unabhängigen Experimenten normalisiert auf die korrespondierende Kontrolle. **(C)** Immunfluoreszenzfärbung der Kontrollzellen und der CEACAM1-3S Transfektante. MICA bzw. ULBP2 sind in Grün dargestellt, die Zellkerne wurden mit DAPI (Blau) gefärbt. **(D)** Vergleich der Oberflächenexpression weiterer NK-Zell-Liganden auf den CEACAM1 Isoform transfizierten Zellen und den Kontrollzellen. MFI Werte wurden auf die Hintergrundexpression normalisiert * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwertes

5.7. CEACAM1-4L erhöht die MMP-vermittelte Freisetzung von löslichen NKG2D Liganden

Es gibt eine Vielzahl von Mechanismen, welche eine Veränderung in der Oberflächenexpression von MICA und ULBP2 vermitteln können. Um dies näher zu analysieren wurden zunächst Gesamt-Lysate der Transfektanten mittels Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich in Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten FACS-Analysen eine erhöhte Expression von MICA und ULBP2 in den CEACAM1-3S Transfektanten (Abbildung 14 A). Im Gegensatz zu diesen FACS Daten jedoch konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von MICA und ULBP2 in den CEACAM1-4L transfizierten Zellen nachgewiesen werden, wobei auf der Oberfläche geringere Level detektiert wurden (Abbildung 14 A). Eine solche Diskrepanz zwischen der Proteinexpression und Oberflächenexpression könnte durch ein verstärktes Freisetzen von membranständigen NKG2D Liganden erklärt werden.

Es ist bereits bekannt, dass die Oberflächendichte von MICA und ULBP2 Molekülen durch proteolytisch aktive Enzyme (z.B. durch ADAM Proteasen und Metalloproteasen) reduziert werden kann (130-132). Diese löslichen NKG2D Liganden können immunprotektiv wirken (123). Aus diesem Grund wurde konditioniertes Zellkulturmedium der transfizierten Zellen auf die enthaltene Menge an löslichen MICA und ULBP2 untersucht (Abbildung 14 B und C). Hierbei zeigte sich sowohl bei den Western Blot Analysen (Abbildung 14 B), als auch bei den durchgeführten ELISA Experimenten (MICA, $p=0,033$; Abbildung 14 C) eine erhöhte Konzentration an löslichen MICA und ULBP2 in den Überständen der CEACAM1-4L Transfektanten. Um zu testen, ob an dieser erhöhten Freisetzung der NKG2DL Metalloproteasen (MMP) beteiligt sind, wurden die Zellen mit dem Breitband-MMP-Inhibitor Marimastat bzw. der Vehikelkontrolle DMSO behandelt. Hierbei zeigte sich, dass die ca. 2,5-fach höhere Freisetzung von MICA durch die Behandlung mit Marimastat auf das Ausgangsniveau der Kontrollzellen verringert ($p=0,033$) werden konnte (Abbildung 14 D). Durch Vorversuche ist bekannt, dass die Ma-Mel-86a Zellen kein MMP-9 exprimieren und dass die Expression dieser Proteinase auch nicht durch die Transfektion mit CEACAM1 induziert wird (Daten nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf wurden die Expressionen von verschiedenen Proteasen sowie deren endogenen Inhibitoren in den CEACAM1- Isoform transfizierten Zellen analysiert (Abbildung 14 E), hierbei zeigte sich, dass Ma-Mel-86a Zellen transfiziert mit CEACAM1-4L signifikant mehr MMP-14 ($p=0,0055$), MMP-2 ($p=0,0198$) und ADAM-10 ($p=0,0464$) exprimieren. Bereits in der Literatur beschrieben findet sich, dass MMP-2 nicht für die proteolytische Freisetzung von MICA verantwortlich ist, jedoch MMP-

14 diesen Effekt vermitteln kann (97). MMP-14 ist ein Regulator von MMP-2 (30;110), weshalb die gesteigerte MMP-2 Aktivität, detektiert in den CEACAM1-4L Zellen (Abbildung 10 F), einen indirekten Nachweis für eine erhöhte Aktivität von MMP-14 darstellt. Basierend auf diesen Daten ist es sehr wahrscheinlich, dass MMP-14 die erhöhte Freisetzung von MICA in den CEACAM1-4L transfizierten Zellen vermittelt.

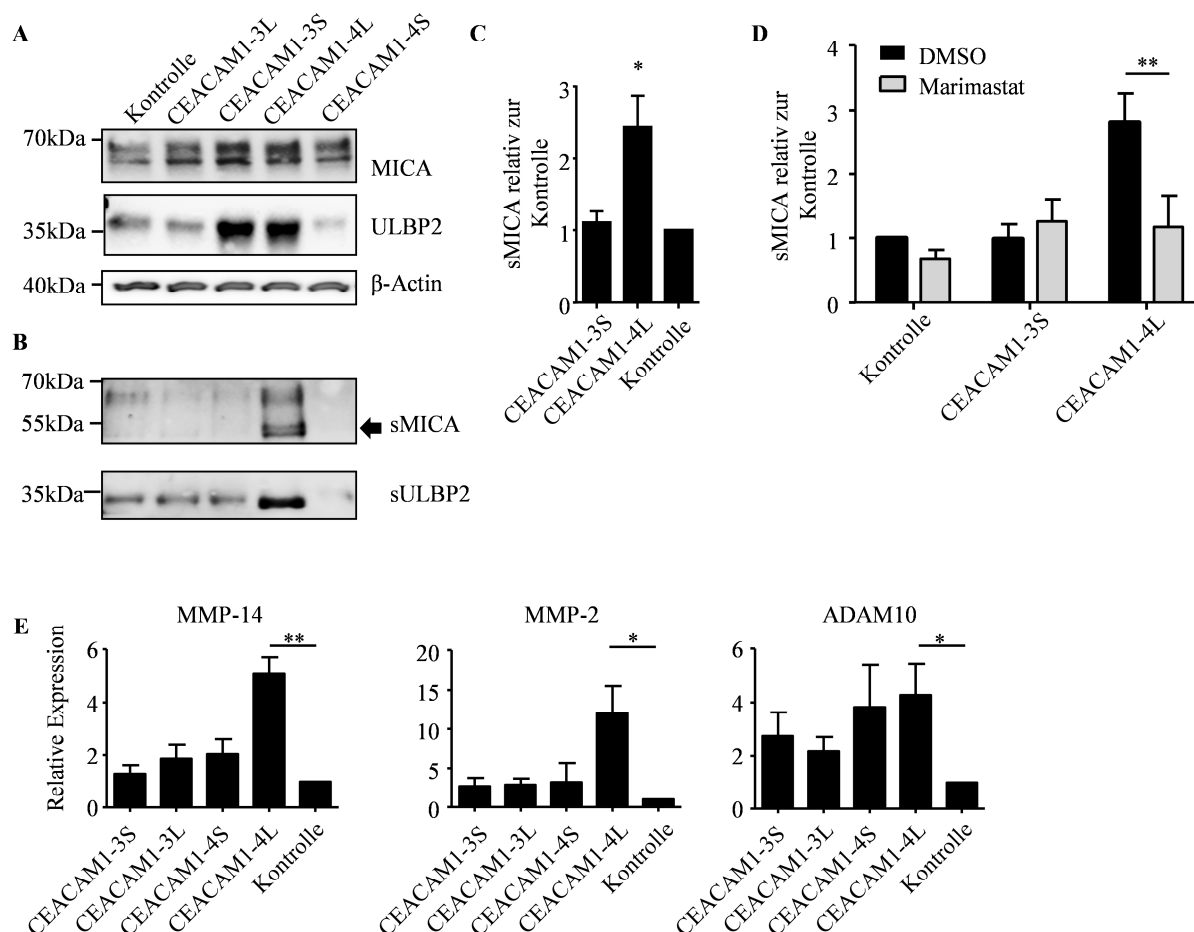


Abbildung 14: CEACAM1-4L erhöht die MMP-vermittelte Freisetzung von NKG2DL

(A) Proteinexpression von MICA und ULBP2 wurden mittels Western Blot in den CEACAM1 Transfektanten analysiert. (B) Mittels Western Blot wurden konditionierte Überstände von CEACAM1-Isoform Transfektanten auf die Menge an löslichen MICA und ULBP1 (*soluble*; sMICA und sULBP2) untersucht. Alle Western Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen. (C) Mittels MICA spezifischen ELISA wurde die Menge an löslichen MICA in den Zellkulturüberständen der Kontrollzellen, der CEACAM1-3S und CEACAM1-4L Transfektanten ermittelt. Gezeigt sind die gemittelten Werte aus 6 unabhängigen Experimenten. (D) Mittels ELISA wurde die lösliche MICA Konzentration nach der Behandlung mit DMSO bzw. Marimastat gemessen. Zur statistischen Auswertung wurden die nicht normalisierten Werte mittels Student's t-Test verglichen. (E) Mittels quantitativer TaqMan RT-PCR (N=3) wurde die Expression von MMP-14, MMP-2, ADAM-10, evaluiert. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwertes.

5.8. CEACAM1-3S erhöht die Immunogenität von Melanomzellen durch die Modulation der NKG2D Liganden Expression

Die zuvor aufgeführten Analysen konnten zeigen, dass CEACAM1-3S-exprimierende Ma-Mel-86a Zellen vermehrt NKG2D und DNAM-1 Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abbildung 13) und weiterhin, dass CEACAM1-4L transfizierte Melanomzellen durch proteolytisches Abspalten die MICA und ULBP2 Dichte auf ihrer Oberfläche verringern (Abbildung 14). Mittels Zytotoxizitäts-Experimenten wurde im Weiteren analysiert, ob die Modulation dieser Liganden einen funktionellen Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen besitzt. Hierzu wurden zunächst unter Verwendung des RTCA xCELLigence Systems Zytotoxizitäts-Experimente durchgeführt, bei denen die NK-Zell vermittelte Lyse der Kontrollzellen, CEACAM1-3S und CEACAM1-4L transfizierten Zellen verglichen wurde (Abbildung 15 A I und B). Hierbei zeigte sich eine gesteigerte Lyse der CEACAM1-3S Transfektanten ($p=0,0016$) im Vergleich zu den Kontrollzellen während keine Veränderung der spezifischen Lyse der CEACAM1-4L Transfektante ($p=0,9416$) detektiert werden konnte (Abbildung 15 A I). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den in Abbildung 15 A I dargestellten Ergebnissen um die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten handelt. Es wurde lediglich bei einem Experiment kein Unterschied für die Zytolyse der CEACAM1-4L Zellen detektiert, jedoch bei jeweils zwei Experimenten eine verringerte bzw. erhöhte Lyse gemessen.

Die zuvor gezeigten Daten deuten darauf hin, dass die gesteigerte Erkennung der CEACAM1-3S Zellen durch NKG2DL vermittelt wird. In weiteren Zytotoxizitäts-Experimenten wurde daher der NKG2D Rezeptor auf den NK-Zellen mittels spezifischer Antikörper blockiert. Durch die Blockade dieses aktivierenden NK-Zell-Rezeptors wurde die Lyse der CEACAM1-3S transfizierten Zellen um ca. 50 % verringert ($p=0,0137$), jedoch nicht bis auf das Niveau der unter gleichen Bedingungen Ko-Kultivierten Kontrollzellen (Abbildung 15 A I). Dies spricht dafür, dass noch weitere NK-Zell Rezeptor-Liganden Systeme eine Rolle spielen. Den Erwartungen entsprechend konnte durch die NKG2D Blockade eine Verringerung der spezifischen Lyse der Kontrollzellen ($p=0,0257$) sowie CEACAM1-4L transfizierten Zellen ($p=0,0141$) bewirkt werden (Abbildung 15 A I). Diese mittels xCELLigence gemessenen Ergebnisse wurden zudem unter Verwendung des bereits gut etablierten CFSE/7AAD FACS-basierten Zytotoxizitäts-Assay evaluiert (Abbildung 15 A II). Bei dieser Methode kann allerdings nur eine Probe nach der anderen gemessen werden, was es nicht ermöglicht die Inkubationszeiten mit 7-AAD und die Zeit der Ko-Kultur in allen Ansätzen gleich zu halten.

Mittels dieses Systems ist es somit nicht möglich so viele Probe parallel zu analysieren, wie es mittels xCELLigence gewährleistet werden kann. Aus diesem Grund wurden mit diesem experimentellen Ansatz lediglich die Kontrollzelllinie und CEACAM1-3S Transfektante verglichen. Hierbei konnte das Ergebnis der xCELLigence basierten Messung bestätigt werden. So wurde auch hier gezeigt, dass die CEACAM1-3S Transfektante ($p=0,031$) sensibler gegenüber der NK-Zell-vermittelten Zytolyse war, verglichen mit den Kontrollzellen. Blockierung des NKG2D Rezeptors zeigte deutlich, dass die NKG2D-vermittelte Erkennung der CEACAM1-3S ($p=0,0085$) transfizierten Zellen reduziert werden konnte. Die spezifische Lyse der Kontrollzellen ($p=0,0113$) wurde durch die NKG2D Blockade ebenfalls verringert, jedoch zu einem geringeren Maß als die der CEACAM1-3S Transfektanten (Abbildung 15A II).

Die bisherigen Ergebnisse basieren auf Experimenten mit Melanomzellen, welche ektopische CEACAM1-Isoformen exprimieren. Um nun zu evaluieren, ob dieser Effekt auch durch endogenes CEACAM1-3S in Melanomzellen bewirkt wird, wurden die Zelllinien Ma-Mel-48a und Ma-Mel-48b analysiert. Hierbei handelt es sich um Zelllinien, welche aus einer Hautmetastase (Ma-Mel-48a) bzw. einer Lymphknotenmetastase (Ma-Mel-48b) des gleichen Patienten etabliert wurden, wodurch keine Donor-spezifischen Unterschiede zwischen den Zelllinien bestanden. Die Zelllinie Ma-Mel-48b exprimiert im Gegensatz zu der Zelllinie Ma-Mel-48a kein CEACAM1-3S, während alle anderen CEACAM1-Isoformen in beiden Zelllinien gleich exprimiert werden (Abbildung 15 C I). Weiterhin konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass die CEACAM1-3S positive Zelllinie Ma-Mel-48a mehr MICA auf der Oberfläche aufweist als die Ma-Mel-48b Zellen (Abbildung 15 C II, $p=0,0265$). Einhergehend mit diesen Daten wurde eine geringere spezifische Lyse der Ma-Mel-48b Zellen, welche eine Stunde nach NK-Zell-Zugabe bei einem E:Z Verhältnis von 1:1 bei 16,2 % lag, verglichen zu den Ma-Mel-48a Zellen, mit einer spezifischen Lyse von 24,3 %, gemessen (Abbildung 15 C III). Die NKG2D Blockade, führte zu einer Verringerung der spezifischen Lyse beider Zelllinien auf ein vergleichbares Niveau (Ma-Mel-48a, 14,5 %; Ma-Mel-48b, 14,2 %) (Abbildung 15 C III).

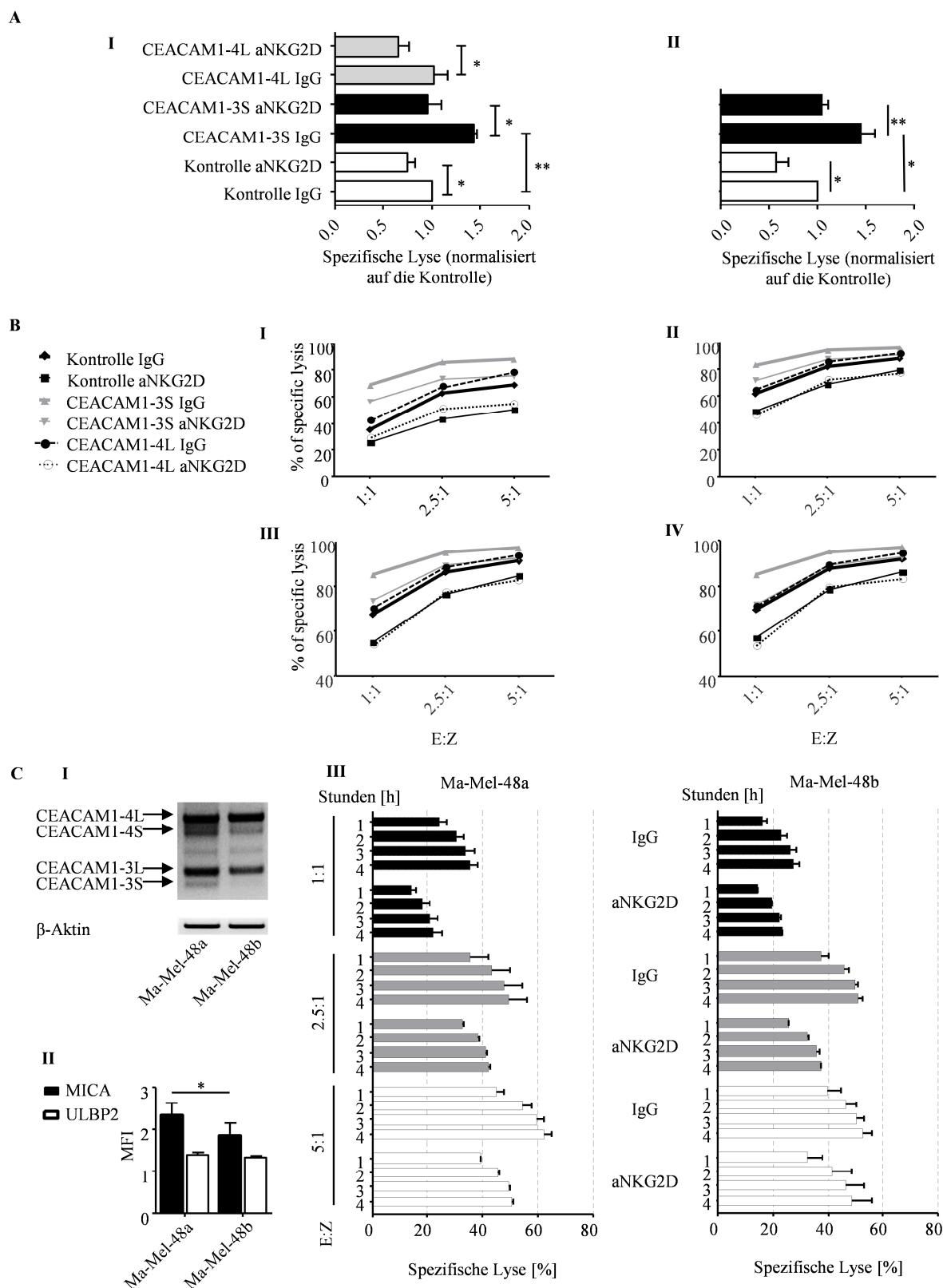


Abbildung 15: CEACAM1-3S erhöht die Immunogenität von Melanomzellen

(A) (I) xCELLigence (II) FACS basiertes Zytotoxizitäts-Experiment mit transfizierten Ma-Mel-86a Zellen. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus 5 unabhängigen Experimenten. Für die xCELLigence basierten Experimente sind die Ergebnisse für ein Effektor- zu Zielzell- (E:Z) Verhältnis von 1:1, zwei Stunde nach Zugabe der NK-Zellen gezeigt. Für die FACS basierte Methode wurde ein E:Z Verhältnis von 10:1 verwendet, die Ko-Kultivierung dauerte hierbei 3h. Um die NKG2D-abhängige Erkennung der Melanomzellen zu blockieren wurden die NK-Zellen vor der Ko-Kultivierung mit anti-NKG2D (aNKG2D) mAb behandelt, als Kontrolle diente hier die korrespondierende IgG Kontrolle. (B) Ein repräsentatives

Zytotoxizitäts-Experiment mit unterschiedlichen E:Z Verhältnissen ist gezeigt. (I) eine Stunde, (II) zwei Stunden, (III) drei Stunden und (IV) vier Stunden nach NK-Zell-Zugabe. (C) Der Einfluss von endogenem CEACAM1-3S auf die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber NK-Zell-vermittelter Lyse ist anhand der Zelllinien Ma-Mel-48a und Ma-Mel-48b gezeigt. (I) Semiquantitative RT-PCR für die CEACAM1-Isoformen. (II) Bestimmung der MICA und ULBP2 Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie (N=4). (III) Ein repräsentatives xCELLigence basiertes Zytotoxizitäts-Experiment aus zwei unabhängigen gezeigt. Die NK-Zellen wurden entweder mit der IgG Kontrolle oder einem NKG2D spezifischen mAb vorbehandelt. Gezeigt sind verschiedene E:Z Verhältnisse 1h, 2h, 3h und 4h nach NK-Zell-Zugabe. Signifikanzen wurden mittels Student's t-Test unter Verwendung der nicht-normalisierten Werte berechnet. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwertes.

Von Stern et al. konnte bereits gezeigt werden, dass die homophile Interaktion zwischen CEACAM1 Molekülen auf der Oberfläche von NK-Zellen und Tumorzellen inhibierend auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wirkt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden Zytotoxizitäts-Experimente bei denen DNAM-1, NKG2D und CEACAM1 auf der Oberfläche der NK-Zellen mittels spezifischer Antikörper blockiert wurden, durchgeführt (Abbildung 16). Es zeigte sich, dass die sterische Störung von homophilen CEACAM1-CEACAM1 Interaktionen zu einer gesteigerten Lyse der CEACAM1-3S Transfektante (24 % Steigerung, 2 h nach NK-Zell Zugabe) führte, wohingegen nur ein geringer Anstieg in der Zytolyse der Kontrollzellen (7 % Steigerung, 2 h nach NK-Zell Zugabe) detektiert wurde (Abbildung 16). Die gleichzeitige Blockierung des NKG2D Rezeptors führte zu einer Verringerung der NK-Zell-vermittelten Lyse der Melanomzellen (Kontrolle, 30 %; CEACAM1-3S, 52,47 % Verringerung, 2 h nach NK-Zell Zugabe). Die spezifische Lyse der Kontrollzellen nach zwei Stunden betrug 29 %, die der CEACAM1-3S Transfektante jedoch 38 %.

Da die Behandlung mit NKG2D spezifischen Antikörpern die Lyse der CEACAM1-3S Transfektanten nicht vollständig auf das Level der Kontrollzellen verringern konnte, (spezifische Lyse nach 2 h Ko-Kultur; Kontrolle, 32 %; CEACAM1-3S, 44 %) wurde vermutet, dass noch weitere NK-Zellrezeptor-Liganden Systeme beteiligt sind. Wie in Abbildung 13 D gezeigt, weisen die CEACAM1-3S transfizierten Zellen ebenfalls eine signifikant erhöhte CD155 Oberflächenexpression auf, wobei es sich um einen Liganden des DNAM-1 Rezeptor handelt. Basierend auf diesen Daten wurde dieser Rezeptor ebenfalls mittels mAk blockiert, was die Lyse der Kontrollzellen (12 % Verringerung, 2 h nach NK-Zell Zugabe) und der CEACAM1-3S transfizierten Zellen (29 % Verringerung, 2 h nach NK-Zell Zugabe) reduzierte. Die simultane Blockade des NKG2D und DNAM-1 Rezeptors führte zu einem additiven Effekt, welcher die spezifische Lyse der Kontrollzellen und der CEACAM1-3S transfizierten Zellen auf ein vergleichbares Niveau (spezifische Lyse der Kontrollzellen, 20 %; CEACAM1-3S, 24 %) verringerte. Diese Daten implizieren, dass die gemeinsame Modulation der DNAM-1 und NKG2D Liganden für die gesteigerte NK-Zell-

vermittelte Zytolyse der CEACAM1-3S transfizierten Ma-Mel-86a Zelllinie verantwortlich ist.

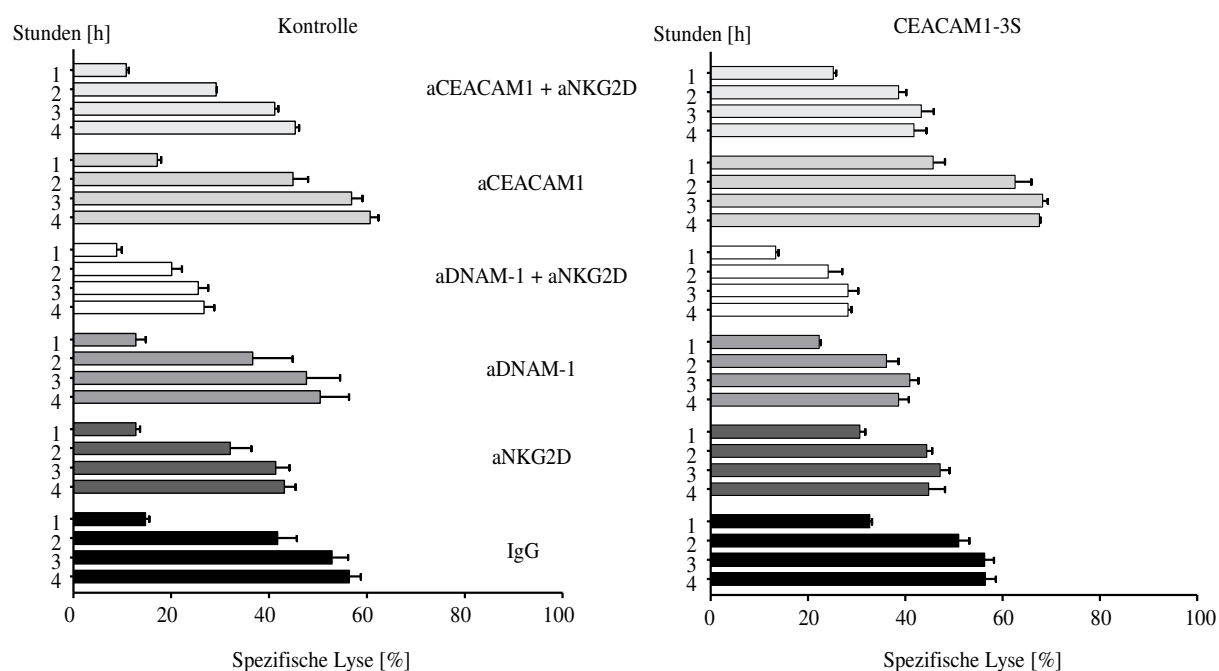


Abbildung 16: Blockade von DNAM-1 und NKG2D verringert die Immunogenitäts-steigernde Wirkung von CEACAM1-3S, während die CEACAM1 Blockade die spezifische Lyse erhöht.

Dargestellt ein repräsentatives Zytotoxizitäts-Experiment, ausgeführt im Duplett-Ansatz, aus 3 unabhängigen Experimenten mit Ma-Mel-86a Zellen transfiziert mit Levektor-Kontroll oder CEACAM1-3S. Die NK-Zellen wurden vor der Ko-Kultivierung 1 h mit Antikörpern spezifisch für NKG2D (aNKG2D), DNAM-1 (aDNAM-1) und CEACAM1 (aCEACAM1, mAK 4/3/17) bzw. mit der IgG Kontrolle inkubiert. Dargestellt ist ein E:Z Verhältnis von 1:1 eine, zwei, drei und vier Stunden nach NK-Zell-Zugabe. Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes

6. Diskussion

CEACAM1 ist in 80 % aller Melanomzellen neo-exprimiert (113) und an verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. die Zellmotilität (32) und die Immunogenität (21;88) beteiligt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wird CEACAM1 als ein potentiell Ziel für zielgerichtete, Immuntherapien (113;125) bzw. als potenten Biomarker (91;152;152) im malignen Melanom diskutiert. Im humanen System werden vier verschiedene Isoformen dieses multifunktionalen Zelladhäsionsmoleküls exprimiert (5), welche sich sowohl in der Anzahl ihrer extrazellulären, als auch in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen unterscheiden. Die Expressionsverhältnisse von CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S und deren klinische bzw. biologische Bedeutung im malignen Melanom sind weitestgehend ungeklärt. Um die Effizienz und Sicherheit von potentiellen CEACAM1 spezifische Therapien im malignen Melanom zu gewährleisten, ist es jedoch essentiell, die Bedeutung der unterschiedlichen Spleißvarianten besser zu verstehen.

6.1. Die CEACAM1-3S Expression korreliert mit dem klinischen Stadium und dem Gesamtüberleben von Melanompatienten

Gambichler und Kollegen konnten bereits zeigen, dass im malignen Melanom die Gesamt-CEACAM1 Expression höher ist als in benignen Nävi (45). Des Weiteren wiesen Thies et al. nach, dass die Expression von Gesamt-CEACAM1 mit der Progression von primären Melanomen korreliert (152). Bisher existieren jedoch keine Studien, in welchen die Relevanz der Expression der einzelnen CEACAM1 Isoformen im malignen Melanom bzw. einer anderen Tumorentitäten untersucht wurde.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden erstmals die einzelnen Expressionsverhältnisse der Isoformen CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S in Melanomzelllinien sowie in Biopsien aufgezeigt. Hierbei ergab sich, dass die Isoformen CEACAM1-4L und -4S stets eine höhere relative Expression in Melanomzelllinien als auch in Biopsien aufwiesen, als die CEACAM1-3 Isoformen. Des Weiteren zeigten sich für die CEACAM1-4L und -3L Varianten eine stärkere Expression als für die korrespondierenden S-Varianten. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde von Ortenberg et al. bereits beschrieben, dass in primären Kulturen von Melanometastasen die CEACAM1-L Varianten stets stärker exprimiert sind als die korrespondierenden S-Varianten (112). Je nach Zelltyp und Malignität gibt es ein spezifisches Verhältnis von CEACAM1-S zu CEACAM1-L,

welches einen Einfluss auf zelltypspezifische Funktion von CEACAM1 hat (47;100). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Kolon-, Leber-, Lungen- und Prostatagewebe CEACAM1-L und CEACAM1-S ko-exprimieren, während im Gehirn, Herzen und Nieren lediglich CEACAM1-L detektiert werden konnte (47). Weiterhin sind in Blasen- und Prostatazellen verstärkt die S-Varianten zu finden (139). In der Lunge und im Kolon wird mehr CEACAM1-L als CEACAM1-S exprimiert (47), was vergleichbar mit den hier gezeigten Daten für das maligne Melanom ist. Weiterhin wurden auch Tumortyp-spezifische Expressionsmuster der CEACAM1 Isoformen nachgewiesen, so exprimieren Kolonkarzinomzellen und Prostatatumore verstärkt die S-Varianten, Brustkrebszellen hingegen weisen eine sehr heterogene CEACAM1 Spleißvarianten Expression auf (47;139). Dies verdeutlicht, dass ein spezifisches CEACAM1-S zu CEACAM1-L Verhältnis essentiell für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase ist. In diesem Kontext wurde gezeigt, dass die Signalweiterleitung von CEACAM1 via SHP-2 und c-Src abhängig von dem vorliegenden CEACAM1-L Monomer/Dimer Gleichgewicht ist, was wiederum durch das Verhältnis CEACAM1-L zu CEACAM1-S moduliert wird (100). Außerdem wird CEACAM1 sehr kontrovers als Tumorsuppressor (66;70;93;139) oder Tumorpromoter (32;91;145;152) diskutiert, was ebenfalls auf unterschiedliche, zelltypspezifische Expressionsmuster der CEACAM1-Isoformen zurückzuführen sein könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das CEACAM1-4S zu CEACAM1-4L Verhältnis in den primären Biopsien (Stadium I/II) höher ist, als in den Metastasen (Stadium III und IV), wobei weder bei den CEACAM1-3 noch CEACAM1-4 S zu L Verhältnissen eine Veränderung zwischen den Stadien III und IV detektiert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass eine Zunahme der CEACAM1-4S Expression einen Einfluss auf die Metastasierung von Melanomzellen haben könnte, was in Übereinstimmung mit dem hier gezeigten Migrations- und Invasionssteigernden Effekten dieser Isoform steht. Jedoch widerspricht es der Beobachtung, dass CEACAM1-4S das matrixunabhängige Wachstum (*anchorage independent growth*) inhibiert. Dies zeigt, dass weitere Experimente notwendig sind, um die genaue Funktion von CEACAM1-4S für den Prozess der Metastasierung von Melanomzellen zu verstehen. Hierbei muss auch der Aspekt einer CEACAM1-4L/ CEACAM1-4S Ko-Expression untersucht werden.

Diese Zunahme der CEACAM1-4S und CEACAM1-3S Expression deutet auf eine stadienabhängige Veränderung des Spleißmechanismus von Exon-7 hin. Das alternative Spleißen der CEACAM1 prä-mRNA innerhalb des Exon 7 wird durch *cis* Elemente reguliert, an welche Stress-induzierbare hnRNP L (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) und

hnRNP A1 Moleküle binden (29). Jedoch gibt es bisher keine Erkenntnisse über die mechanistische Kontrolle der Exon 5 (CEACAM1-3 / CEACAM1-4) Spleißmaschinerie, welche die Zunahme der CEACAM1-3 Isoformenexpression während der Progression des malignen Melanoms erklären könnte.

Von Ortenberg et al. wurde gezeigt, dass 89 % der von ihnen analysierten Melanome eine CEACAM1 Expression aufweisen (113). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass CEACAM1 in 72 % der Melanomzelllinien und 88 % der Biopsien detektiert werden konnte. Wie in der Einleitung beschrieben, zeigt MCAM ein ähnliches Expressionsmuster im malignen Melanom (67;162). Diese Daten verdeutlichen das Potential von CEACAM1 als neuen Biomarker für das maligne Melanom. So konnte von Thies et al. bereits gezeigt werden, dass die Detektion von Melanomzellen in Schildwächterlymphknoten mittels CEACAM1 spezifischen monoklonalen Antikörper (4D1/C2) signifikant sensitiver ist, als der Nachweis etablierter, melanomspezifischer Standardmarker wie z.B. MelanA, S100 oder HMB45 (151).

Wenn CEACAM1 in Melanombiopsien exprimiert wurde, dann konnte auch stets CEACAM1-4L als prädominante Variante detektiert werden. Interessanterweise konnten ausschließlich die CEACAM1-4 Varianten in 50 % der primären Biopsien, verstärkt in den Stadium II Biopsien, detektiert werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die neo-Expression der CEACAM1-4L und -4S Varianten ein frühes Ereignis in der Tumorinitiierung darstellt.

Zudem lassen diese Daten vermuten, dass die von Gambichler et al. beschriebene Induktion von CEACAM1 in Melanomzellen (45) sowie die Beschreibung von Thies et al., dass CEACAM1 ein prädiktiver Marker für die Progression der Melanomerkrankung sei, sich hauptsächlich auf Expressionsveränderungen der CEACAM1-4 Varianten beziehen. Thies et al. als auch Gambichler et al. haben lediglich primäre Melanome, in denen vor allem CEACAM1-4 Varianten exprimiert sind, analysiert. Die klinische und funktionelle Bedeutung der CEACAM1-3 Isoformen wurden im malignen Melanom bisher nicht näher analysiert. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt werden, dass die Expression von CEACAM1-3S und -3L mit dem klinischen Stadium der Melanompatienten korreliert. Im Gegensatz dazu konnte eine solche Korrelation für CEACAM1-4S nicht gezeigt werden und eine Induktion von CEACAM1-4L wurde nur für den Übergang von Stadium I/II in Stadium III beobachtet. So zeigte sich, dass CEACAM1-3L prädominant und CEACAM1-3S ausschließlich in den fortgeschrittenen Melanomen der Patienten des Stadiums III und IV

detektiert werden konnte und somit einen potentiellen Marker für die Melanomprogression darstellt. Ausführliche Überlebensanalysen der Patienten haben ergeben, dass Patienten deren Melanome eine CEACAM1-3S Expression aufwiesen, ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben zeigten. Thies et al. beschrieb jedoch, dass eine CEACAM1 Expression in Melanomen von Patient im Stadium I und II mit einer schlechteren Prognose dieser einhergehen, was zunächst einmal widersprüchlich zu unseren Daten erscheint. Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass in dieser Studie lediglich immunhistochemisch die Gesamt-CEACAM1 Expression analysiert (152) und nicht zwischen den verschiedenen Isoformen unterschieden wurde. Zudem ist es sehr überraschend, dass lediglich 40 % der analysierten Melanome CEACAM1 exprimierten, während sowohl Ortenberg et al. (113) als auch die hier gezeigten Daten deutlich zeigen, dass mehr als 80 % aller Melanome CEACAM1 exprimieren. Es könnte nun spekuliert werden, dass die immunhistochemische Färbung mittels mAK (4D1/C2) verstärkt zu falsch negativen Ergebnissen führte oder die von Thies et al. analysierte Patientenkohorte sich stark von der aus Israel (Markel et al., (91)) und Essen (die hier gezeigten Daten) unterscheidet. Weitere umfangreiche, prospektive Studien sind daher essentiell um die Bedeutung der CEACAM1-3L und besonders der CEACAM1-3S Variante als einen prognostischen Biomarker weiter zu evaluieren. Es wurde außerdem gezeigt, dass erhöhte Konzentrationen an löslichem CEACAM1 im Blut von Melanompatienten invers mit deren Gesamtüberleben korreliert (91). Basierend auf dieser Studie wäre es wichtig zu untersuchen ob Melanomzellen mit CEACAM1-3S Expression veränderte Mengen an löslichen CEACAM1 freisetzen, bzw. welche CEACAM1-Spleißvarianten als lösliche Proteine im Blut von Melanompatienten nachgewiesen werden können.

6.2. Die zelluläre Lokalisation und funktionelle Eigenschaften von CEACAM1 sind abhängig von der Anzahl an extrazellulären und der Länge der zytoplasmatischen Domänen

CEACAM1 ist beschrieben als Zelladhäsionsmolekül, welches hauptsächlich auf der Zelloberfläche präsentiert wird (42;101;122;148). Diese Lokalisation wird von GTPasen reguliert (42). Anhand der generierten CEACAM1 Isoform-Transfektanten konnte ich erstmals zeigen, dass die Anzahl der extrazellulären Domänen eine bedeutende Rolle für die zelluläre Lokalisation von CEACAM1 spielt. Dabei wurde CEACAM1-4L und CEACAM1-4S prädominant an der Zellmembran detektiert, mit einer höheren Intensität an Zell-

Zellkontakten. Ähnliche Ergebnisse wurden in Mausepithelzellen bereits von Sadekova et al. beschrieben, jedoch lag der Fokus dieser Studie lediglich auf Gesamt-CEACAM1-L und -CEACAM1-S (122). Hierbei ist ebenfalls zu beachten, dass in Mauszellen zwei CEACAM1 Gene transkribiert werden, welche als *Ceacam1a* und *Ceacam1b* bezeichnet werden. Von diesen Maus-CEACAM1 Genen werden zudem durch alternatives Spleißen je vier unterschiedliche Isoformen generiert. Diese Isoformen besitzen entweder eine lange oder kurze zytoplasmatische Domäne, ähnlich wie im Menschen, jedoch entweder vier oder zwei extrazelluläre Domänen, was sich vom humanen System unterscheidet (106). In Hinblick auf die Lokalisation von CEACAM1-3S und CEACAM1-3L zeigte sich in den hier präsentierten Färbungen eine abweichende Lokalisation. Beide Varianten wurden vor allem in zytoplasmatischen Vesikeln detektiert, welche um den Nukleus akkumulierten. Doppelfärbungen mit Phalloidin ergaben, dass es wahrscheinlich einen aktiven, zielgerichteten Transport dieser Vesikel zur Plasmamembran gibt, welcher durch Aktinfilamente vermittelt wird. Es wurde bereits beschrieben, dass CEACAM1-L indirekt und direkt mit F-Aktin (122) und Tropomyosin (132) interagieren kann. Wie allerdings die Rekrutierung der CEACAM1-3S positiven Vesikel zur Zellmembran erfolgt, bleibt offen. Möglicherweise könnten Motorproteine, welche einen intrazellulären Transport solcher Vesikeln vermitteln, daran beteiligt sein. Ähnlich wie CEACAM1 wurde auch für Cadherine beschrieben, dass diese Zelladhäsionsmoleküle mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren können (54). Für VE (*vascular endothelial*)-Cadherin ist bereits bekannt, dass dieses mit dem Motorprotein Myosin-X interagiert (1). Eine Interaktion von CEACAM1 mit Myosin-X ist ebenfalls denkbar, allerdings muss in weiterführenden Experimenten näher analysiert werden, mit welchen Myosinen, den einzigen Aktin-assoziierten Motorproteinen, CEACAM1 wirklich interagiert.

Die Anzahl der extrazellulären Domänen hat nicht nur einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation der CEACAM1 Moleküle, sondern auch auf die funktionellen Eigenschaften dieser Proteine. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CEACAM1-4L und CEACAM1-4S die Melanomzellmigration und -invasion fördern, während CEACAM1-3L nur eine leichte Erhöhung der Migration, aber keine signifikante Änderung der Invasionsfähigkeit der Zellen hervorruft. Interessanterweise jedoch, verringert die Expression von CEACAM1-3S signifikant die Melanomzellmotilität. Dies widerspricht dem bisherigen Dogma, dass lediglich die zytoplasmatische Domäne (32;66;70) und die Transmembrandomäne (101) für die CEACAM1-vermittelte Signalweiterleitung verantwortlich sind. So besitzen die Isoformen CEACAM1-4S und CEACAM1-3S homologe

zytoplasmatische und transmembrane Domänen, unterscheiden sich allerdings in der Anzahl ihrer extrazellulären Domänen. Ebrahimnejad et al. beschrieb für CEACAM1-L einen Motilitäts-steigernden Effekt, welcher abhängig von der L-Domäne (Tyr488) ist, wohingegen CEACAM1-S keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit ausübte (32). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch CEACAM1-4S einen Motilitäts-steigernden Effekt bewirkt. Die Kontrolle der von Ebrahimnejad et al. verwendeten Primer für die Synthese von CEACAM1-4S aus einem CEACAM1-4L Plasmid legt jedoch nahe, dass das so klonierte Konstrukt nicht dem CEACAM1-4S Transkript entspricht. Der verwendete Leitstrangprimer beginnt erst ab Nukleotid 878 der kodierenden Sequenz (32), was zur Folge hat, dass sowohl die N-Domäne (200 bp-559 bp) als auch die A1-Domäne (560 bp-839 bp) nicht mehr im Protein enthalten sind. Basierend auf den in dieser Publikation angegebenen Informationen könnte nun vermutet werden, dass sich die gezeigten Daten nicht auf das Wildtyp CEACAM1-4S beziehen und somit Einflüsse der extrazellulären Domänen nicht detektiert wurden. In diesem Zusammenhang muss ebenfalls erwähnt werden, dass die N-terminale Domäne, welche in dem von Ebrahimnejad et al. verwendeten CEACAM1-4S Konstrukt nicht enthalten ist, für die *trans*-Interaktion und Aktivierung von CEACAM1 essentiell ist (73;160). Dies verdeutlicht erneut, dass die biologische Bedeutung der CEACAM1 extrazellulären Domänen bisher nicht umfassend genug analysiert wurde.

Die Invasion von Tumorzellen ist ein dynamischer, komplexer, sukzessiver Prozess bei dem die proteolytische Degradierung von Komponenten der Basalmembran und der extrazellulären Matrix essentiell sind (25). In Melanomzellen konnte bereits gezeigt werden, dass MMP-9 und MMP-2 wichtig für die Metastasierung sind (59;60). Die hier gezeigten Analysen verdeutlichen, dass ebenfalls Matrix-Metalloproteasen an der Invasions-steigernden Wirkung von CEACAM1-4L und CEACAM1-4S beteiligt sind. Da die Zelllinie Ma-Mel-86a endogen kein MMP-9 exprimiert ist es sehr wahrscheinlich, dass MMP-2 eine wichtige Rolle für diese CEACAM1-4L und -4S vermittelten Prozesse spielt. Zudem konnte eine verstärkte Aktivität von MMP-2 in den CEACAM1-4L transfizierten Zellen, im Vergleich zu den restlichen Klonen nachgewiesen werden. Weiterhin führte die Blockierung von MMPs mittels spezifischen Inhibitor Marimastat zu einer Inhibierung des Invasions-steigernden Effektes von CEACAM1-4L und CEACAM1-4S.

Die Hauptursache für melanomassoziierte Todesfälle ist die Metastasierung der Tumorzellen während der Tumorprogression (99). MMPs spielen hierbei eine essentielle Rolle, indem sie für den Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) verantwortlich sind, welches den initiale

Schritt für die Invasion und Metastasierung von malignen Zellen darstellt (126). Die Metastasierung von Tumorzellen korreliert mit der Fähigkeit von Tumorzellen ohne Kontakt zur EZM zu wachsen (*anchorage independent growth*) (99). In Transplantationsversuchen konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, welche eine höhere Matrixunabhängigkeit zeigen, ein höheres metastatisches Potential aufweisen (23;95). Weiterhin zeigten bereits verschiedene Studien, dass primäre Zellen, welche aus Metastasen etabliert wurden, ein höheres Vermögen unabhängig von der EZM bzw. von anderen Zellen zu wachsen aufweisen als Zellen isoliert aus primären Tumoren (109;119;149). Im Jahre 2009 konnte mittels Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass eine Verbindung zwischen dem metastatischen Potential von Tumorzellen und der Fähigkeit *in vitro* matrixunabhängig zu wachsen existiert (99). Kolonie-Formierungs-Experimente ergaben, dass CEACAM1-4L transfizierte Melanomzellen, welche auch ein höheres Invasionspotential gezeigt haben, größere Kolonien im Softagar gebildet haben als die Kontrollzellen, was auf eine erhöhte Tumorigenität dieser Zellen schließen lässt. CEACAM1-4S und CEACAM1-3S Transfektanten hingegen wiesen ein verringertes Potential der Kolonienbildung auf. So bilden CEACAM1-3S transfizierte Zellen weniger Kolonien als die Kontrollzellen. Jedoch unterscheiden sich die gebildeten Kolonien nicht in ihrer Größe. Die Expression von exogenem CEACAM1-4S hingegen führte nicht nur zu einer verringerten Anzahl an Kolonien sondern auch zu einer geringeren Größe dieser. Quantitative Expressionsanalysen der Metalloproteasen MMP-2 und MMP-14 haben in Übereinstimmung mit den Soft-Agar Kolonie-Assay ergeben, dass die CEACAM1-4L transfizierten Zellen eine höhere Expression dieser Proteasen aufwiesen. Zudem konnte eine erhöhte Aktivität von MMP-2 mittels Zymographie nachgewiesen werden. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass sowohl MMP-2 (9) als auch dessen Aktivator MMP-14 (74;75) eine wichtige Rolle für das matrixunabhängige-Wachstum spielen. So wurde gezeigt, dass die Expressionsstärken von MMP-14 mit der Aktivität von MMP-2 korreliert (126), was in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten steht. MMP-14 wurde in diesem Kontext bereits als Schlüsselenzym für Invasion, Metastasierung und Morphogenese beschrieben (126). Neben den bereits erwähnten, biologischen Funktionen von MMP-14, konnte auch eine Interaktion zwischen Erk (*extra-cellular signal-regulated kinase*) und MMP-14 nachgewiesen werden. Außerdem wurden ebenfalls in verschiedenen Studien eine Verbindung zwischen CEACAM1 und Erk nachgewiesen (130;137;163). Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass CEACAM1-4L via Erk1/2 die Expression von MMP-14 reguliert, was zum einen zu der erhöhten Aktivität von MMP-2 führen könnte und zum anderen zu einer gesteigerten Invasion und erhöhten Fähigkeit matrixunabhängig zu wachsen (126). Allerdings sind weitere

Analysen essentiell, um diese Hypothese zu bestätigen. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression von ADAM10 in CEACAM1-4L transfizierten Zellen detektiert werden. In diesem Kontext wurde bereits nachgewiesen, dass eine erhöhte ADAM10 Expression mit einer verstärkten Fähigkeit der Zellen matrixunabhängig zu wachsen einhergeht und dass ADAM10 verstärkt in Melanommetastasen exprimiert wird (81). Die hier präsentierten Daten sind die erste Beschreibung, dass CEACAM1 einen Isoform-spezifischen Einfluss auf das matrixunabhängige Wachstum von Melanomzellen hat. In hepatozellulären Karzinomzellen (HepG2) konnte ebenfalls eine CEACAM1-vermittelte Induktion eines matrixunabhängigen Wachstums nachgewiesen werden (61). Hokari et al. konnte zeigen, dass endogenes CEACAM1, von ihnen postuliert CEACAM1-4L, eine duale Rolle in hepatozellulären Karzinomzellen ausübt, so hat die Expression von CEACAM1 einen inhibierenden Effekt auf das matrixabhängige Wachstum jedoch einen steigernden Effekt auf das matrixunabhängige Wachstum dieser Zellen (61).

6.3. CEACAM1 Isoform-spezifische Modulation der Immunogenität von Melanomzellen

Von Richard Blumberg und seiner Gruppe wurde 2011 bereits beschrieben, dass die CEACAM1 Expression in Tumorzellen zu einer intrazellulären Retention der NKG2D Liganden führt und daher immunprotektiv wirkt (21). Diese Beobachtung wurde sowohl in Mauszelllinien als auch in humanen Kolon- und Prostatakarzinomzelllinien bestätigt (21). Des Weiteren zeigte die Gruppe in dieser Arbeit, dass der immunprotektive Effekt nur durch CEACAM1-3L und CEACAM1-3S vermittelt wird, weshalb die Autoren einen ITIM-Motiv-unabhängigen Mechanismus postulieren. Weiterführend wurde eine CEACAM1 stark-positive und eine CEACAM1 schwach exprimierende Melanomzelllinie verglichen, wobei sich eine inverse Korrelation zwischen der CEACAM1 und der MICA/B Expression zeigte. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass NKG2D Liganden sehr heterogen in Melanommetastasen exprimiert sind (114). Dies macht es wahrscheinlich, dass die Unterschiede in der MICA/B Expression nicht zwingend auf CEACAM1 zurückzuführen sind. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie unterschiedliche CEACAM1 Isoformexpressionen und deren Einfluss auf die Expression von NK-Zellliganden in einer Melanomzelllinie analysiert, welche aus Metastasen ein und desselben Patienten stammen. In Übereinstimmung mit Chen et al. (21), zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der MICA Expression und der von CEACAM1-4L. Wobei hier zusätzlich noch gezeigt wurde, dass die Expressionen von CD155 und CD112 in CEACAM1-4L transfizierten Zellen

ebenfalls verringert sind. Da CEACAM1-4L die höchste Abundanz in Melanomzellen zeigte, ist es ebenfalls möglich, dass die von Chen et al. gezeigten Beobachtungen in den Melanomzellen sich auf CEACAM1-4L-vermittelte Effekte zurückführen lassen. Jedoch konnte in den CEACAM1-4L transfizierten Zellen keine Veränderung in der Sensitivität gegenüber der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität detektiert werden. Die hier gezeigten Zytotoxizitätsexperimente wiesen jedoch eine hohe Varianz auf. Diese Heterogenität könnte in den verwendeten NK-Zellen begründet liegen. Für die hier durchgeführten Experimente wurden NK-Zellen verwendet, welche aus gesunden Spendern isoliert wurden. Jedoch wurde bereits gezeigt, dass NK-Zellen aus Melanompatienten durch einen veränderten Phänotyp gekennzeichnet sind. Diese NK-Zellen zeigen eine verringerte Expression von NKp46, NKp30 und CD16 (91). Dies legt die Vermutung nahe, dass NK-Zellen aus Melanompatienten stärker von NKG2D Rezeptor-Signalen abhängig sein könnten, da die Expression dieses Rezeptors nicht verändert ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass NK-Zellen aus Melanompatienten eine verstärkte CEACAM1 Expression aufweisen (91) und dass die Interaktion von Melanomzell-CEACAM1 und NK-Zell-CEACAM1 zu einer funktionellen Inhibition der NK-Zellen führt (92). Berücksichtigt man nun, dass CEACAM1 prädominant auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, so könnte spekuliert werden, dass die CEACAM1-4L Expression im malignen Melanom eine protektive Wirkung gegenüber der Patienten-NK-Zell-vermittelten Zytolyse bewirken könnte. Diese Vermutung muss jedoch in weiterführenden Experimenten noch umfassender analysiert werden.

Die dargelegten Ergebnisse verdeutlichen außerdem, dass CEACAM1-4L die MMP-vermittelte, proteolytische Abspaltung von MICA und ULBP2 in Melanomzellen erhöht. So konnten die erhöhten Konzentrationen an löslichen MICA im Zellkulturüberstand der CEACAM1-4L Transfektanten durch die Behandlung der Zellen mit dem Breitband MMP-Inhibitor Marimastat auf das Niveau der Kontrollzellen reduziert werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass lösliche NKG2D Liganden eine klinische Signifikanz besitzen. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen an löslichen ULBP2 im Serum von Melanompatienten mit einer schlechteren Prognose dieser Patienten einhergeht (114). Ebenfalls ist beschrieben, dass sowohl ULBP2 als auch MICA als lösliche Form durch die Aktivität von Metalloproteasen freigesetzt werden (22;124;158). Für MICA konnte nachgewiesen werden, dass MMP-14 diese proteolytische Abspaltung unabhängig von Disintegrinen, ADAMs und anderen Metalloproteasen vermittelt (124). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls gezeigt, dass MMP-14 sowie MMP-2, dessen Aktivität durch MMP-14 reguliert wird (33;110), verstärkt in den CEACAM1-4L transfizierten Zellen exprimiert

werden. Dies deutet darauf hin, dass CEACAM1-4L via MMP-14 die Freisetzung von MICA vermittelt. Weiterführende Studien sind jedoch nötig, um den Regulationsmechanismus von MMP-14 besser zu verstehen.

Die kürzeste CEACAM1 Isoform, CEACAM1-3S, führte zu einem konträren Effekt. In den CEACAM1-3S transfizierten Ma-Mel-86a Zellen wurde eine erhöhte Expression von MICA, ULBP2 und CD155 detektiert, welche ebenfalls mit einer erhöhten NK-Zell-vermittelten Zytolyse dieser Zellen korrelierten. Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass CEACAM1 einen Einfluss auf die Expression von DNAM-1 Liganden (CD115 und CD112) ausübt. Weiterhin konnten wir mittels des Zellliniensystems Ma-Mel-48a zeigen, dass auch endogenes CEACAM1-3S diesen Effekt auf MICA ausübt. Chen et al. zeigten jedoch, dass die CEACAM1-3S Expression in Kolonkarzinomzellen zu einer verringerten MICA Expression führt (21). Dies verdeutlicht erneut die stark Zelltyp-spezifische Funktionalität von CEACAM1. Im Kolonkarzinom fungiert CEACAM1 als Tumorsuppressor (108) während im Melanom die CEACAM1 neo-Expression mit der Tumorprogression korreliert (152). Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre es durchaus denkbar, dass CEACAM1-3S in Melanomzellen einen anderen Effekt auf die Immunogenität als in Kolonkarzinomzellen ausübt. Jedoch sind hierzu weitere, vergleichende Studien notwendig. Der Immunogenitäts-steigernde und Motilitäts-verringende Effekt von CEACAM1-3S in Verbindung mit der verringerten Tumorigenität könnte, zumindest in Teilen, das verlängerte Gesamtüberleben von Melanompatienten, deren Tumore eine CEACAM1-3S Expression aufweisen, erklären.

Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit ebenso gezeigt werden, dass die Antikörper-vermittelte Blockade von CEACAM1 exprimiert auf IL-2 aktivierten NK-Zellen, zu einer erhöhten Lyse der CEACAM1-3S Zellen führt. Dies steht in Übereinstimmung zu einer von Markel et al. publizierten Arbeit, in der er *in vitro* und *in vivo* zeigt, dass die Blockade der CEACAM1 *trans*-Interaktion zwischen Melanomzell-CEACAM1 und T Zell-CEACAM1 zu einer erhöhten, Antigen-restriktiven Erkennung und Lyse der Melanomzellen führt (113). Dies verdeutlicht, dass CEACAM1 ein vielversprechendes Ziel für anti-Melanom Therapien darstellt. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten beweisen jedoch ebenfalls, wie wichtig es ist den Einfluss der einzelnen CEACAM1 Isoformen besser zu verstehen, um die Sicherheit und Effizienz eines CEACAM1-basierten Therapieansatzes zu gewährleisten.

7. Zusammenfassung

Das maligne Melanom beruht auf der Entartung von Pigmentzellen (Melanozyten) in der Haut und stellt die aggressivste Form aller Hauttumore dar. Das hohe Metastasierungspotential von Melanomzellen bestimmt hierbei die hohe Anzahl an melanomassoziierten Todesfällen. Die Deregulierung von Zelladhäsionsmolekülen nimmt hierbei eine entscheidende Rolle ein. So konnte gezeigt werden, dass die neo-Expression des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 in Melanomzellen mit einer gesteigerten Motilität dieser einhergeht und folglich mit einer schlechteren Prognose für Melanopatienten im frühen Stadium (I und II) korreliert. Da CEACAM1 nicht auf Melanozyten, jedoch auf ~80 % aller Melanomzellen exprimiert ist, gibt es neue Ansätze für CEACAM1-basierte Immuntherapien. Im humanen System werden vier CEACAM1 Spleißvarianten exprimiert, wobei keine umfassenden Studien durchgeführt wurden, welche sich mit der klinischen und biologischen Bedeutung dieser Spleißvarianten befassen. Es ist bekannt, dass die Isoformen CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S durch alternatives Spleißen generiert werden, diese unterscheiden sich in der Anzahl ihrer extrazellulären Domänen und der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen.

In der vorliegenden Doktorarbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass alle vier CEACAM1 Spleißvarianten sowohl in Melanomzelllinien als auch in Melanombiopsien exprimiert werden. Dabei korreliert die Expression der CEACAM1-3 Isoformen signifikant mit dem klinischen Stadium der Melanopatienten. Zudem ergab sich eine Korrelation zwischen der CEACAM1-3S Expression in Melanomen und einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben von Melanopatienten. Experimente mit CEACAM1 Isoform-spezifischen Transfektanten lassen vermuten, dass das verlängerte Überleben dieser Patienten in einer verringerten Motilität und einer erhöhten Immunogenität der CEACAM1-3S exprimierenden Melanomzellen begründet ist. In der hier präsentierten Arbeit zeigte sich, dass CEACAM1-3S die Migrations- und Invasionsfähigkeit von Melanomzellen und die Fähigkeit matrixunabhängig zu wachsen vermindert. Zudem konnte eine Korrelation zwischen der CEACAM1-3S Expression und der Oberflächenexpression von MICA, ULBP2 und CD155 festgestellt werden. Bei diesen Molekülen handelt es sich um Liganden für die aktivierenden NK-Zellrezeptoren NKG2D bzw. DNAM-1. Die erhöhte Expression dieser Liganden ging mit einer erhöhten NK-Zell-vermittelten Zytolyse der CEACAM1-3S-exprimierenden Melanomzellen einher. Weiterhin ergaben die Analysen der restlichen Isoformen antagonistische Effekte. Für die CEACAM1-4 Isoformen konnten motilitätssteigernde Effekte

nachgewiesen werden, welche bei CEACAM1-4L wahrscheinlich auf die gesteigerte Aktivität der Metalloproteinase MMP-2 zurückzuführen sind. Ferner führte die Expression von CEACAM1-4L zu einer gesteigerten MMP-14-vermittelten Freisetzung von MICA und einer daraus resultierenden Verringerung der Oberflächenexpression dieses NKG2D Liganden.

Immunfluoreszenzanalysen wiesen eine Isoform-spezifische Lokalisation der CEACAM1 Spleißvarianten nach. Es zeigte sich, dass die CEACAM1-4 Varianten vor allem auf der Zelloberfläche lokalisiert sind, während die CEACAM1-3 Varianten hauptsächlich in zytoplasmatischen, vesikulären Strukturen detektiert wurden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte ich erstmals zeigen, dass die CEACAM1 Isoformen sowohl klinisch als auch biologisch antagonistische Effekte in Melanomzellen ausüben, wobei ich weiterhin zeigen konnte, dass entgegen vorheriger Annahmen, die Anzahl der extrazellulären Domänen regulatorische Einflüsse auf die Signalweiterleitung von CEACAM1 haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen wesentlich zu einem besseren Verständnis über die Funktion der unterschiedlichen CEACAM1 Spleißvarianten bei, welches essentiell ist, um die Sicherheit und Effizienz von neuen, potentiellen CEACAM1-basierenden Therapieansätzen zu gewährleisten.

8. Summary

Malignant Melanoma is the most aggressive skin cancer which arises from pigmented cells (melanocytes) located in the skin. Deregulation of cell adhesion molecules, like CEACAM1, has been shown to be essential for metastatic spread the leading course of death. It has been shown that expression of the cell adhesion molecule CEACAM1 enhances the melanoma cell motility and correlates with the development of metastatic disease. CEACAM1 is not expressed by melanocytes but in the majority of all melanoma. Thus, novel CEACAM1 anti-melanoma therapies are currently being investigated. Four different splice variants of CEACAM1 have been shown to be expressed in human tissue. Nevertheless no comprehensive studies exist, analyzing the clinical and biological role of these isoforms so far. The CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L and CEACAM1-3S isoforms are generated by alternative splicing of CEACAM1, whereas these isoforms differ in number of their extracellular domains and length of their cytoplasmic domain.

This study shows for the first time that all four CEACAM1 isoforms are expressed in malignant melanoma, whereby the expression of the CEACAM1-3S variant correlates with patient clinical stage and results in prolonged patient overall survival. Analyses of specific CEACAM1 isoform transfectants implicated that the prolonged overall survival could be caused by reduced cell motility and enhanced immunogenicity of CEACAM1-3S expressing melanoma cells. This study shows for the first time that CEACAM1-3S reduces the migratory and invasive capacity but also inhibit the anchorage independent growth of melanoma cells. Furthermore, CEACAM1-3S increases the surface expression of MICA, ULBP2 and CD155, all ligands for the activating NK cell receptors NKG2D and DNAM-1. As a consequence thereof an increased NK cell-mediated lysis of CEACAM1-3S transfected melanoma cells could be detected. Furthermore, analyses of the remaining CEACAM1 isoforms showed that CEACAM1 splice variants act in an antagonistic fashion. I could show that CEACAM1-4L and CEACAM1-4S enhances the migratory and invasive capacity, whereby this was probably mediated by enhanced MMP-2 activities, shown at least for CEACAM1-4L. Furthermore, the presented data indicate that CEACAM1-4L downregulates cell surface levels of the NKG2D ligands MICA and ULBP2 by enhanced shedding, thereby promoting malignant phenotype.

Immunofluorescence analysis revealed an isoform specific cellular localization for CEACAM1 splice variants. Here, it was shown that CEACAM1-4L and CEACAM1-4S is

predominately localized at the cell surface, while CEACAM1-3 isoforms were mainly detected in vesicular-like structures, accumulated around the nucleus.

The presented study shows for the first time that CEACAM1 isoforms have different, in parts antagonistic, clinical and biological functions in malignant melanoma. Herein, it was shown that the extracellular domains of CEACAM1 have also an impact on the signal transduction of CEACAM1. This study significantly contributed to a better understanding of the functional relevance of the different CEACAM1 isoforms in melanoma, which is essential to ensure the safety and efficiency of novel CEACAM1-based anti-melanoma immunotherapies.

9. Literaturverzeichnis

1. Almagro,S., Durmort,C., Chervin-Petiot,A., Heyraud,S., Dubois,M., Lambert,O., Maillefaud,C., Hewat,E., Schaal,J.P., Huber,P. et al 2010. The motor protein myosin-X transports VE-cadherin along filopodia to allow the formation of early endothelial cell-cell contacts. *Mol. Cell Biol.* **30**:1703-1717.
2. Bacon,L., Eagle,R.A., Meyer,M., Easom,N., Young,N.T., and Trowsdale,J. 2004. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J. Immunol.* **173**:1078-1084.
3. Balch,C.M., Gershenwald,J.E., Soong,S.J., Thompson,J.F., Atkins,M.B., Byrd,D.R., Buzaid,A.C., Cochran,A.J., Coit,D.G., Ding,S. et al 2009. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* **27**:6199-6206.
4. Bamberger,A.M., Riethdorf,L., Nollau,P., Naumann,M., Erdmann,I., Gotze,J., Brummer,J., Schulte,H.M., Wagener,C., and Loning,T. 1998. Dysregulated expression of CD66a (BGP, C-CAM), an adhesion molecule of the CEA family, in endometrial cancer. *Am. J. Pathol.* **152**:1401-1406.
5. Barnett,T.R., Drake,L., and Pickle,W. 1993. Human biliary glycoprotein gene: characterization of a family of novel alternatively spliced RNAs and their expressed proteins. *Mol. Cell Biol.* **13**:1273-1282.
6. Beauchemin,N., and Arabzadeh,A. 2013. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **32**:643-671.
7. Beauchemin,N., Draber,P., Dveksler,G., Gold,P., Gray-Owen,S., Grunert,F., Hammarstrom,S., Holmes,K.V., Karlsson,A., Kuroki,M. et al 1999. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* **252**:243-249.
8. Beauchemin,N., Draber,P., Dveksler,G., Gold,P., Gray-Owen,S., Grunert,F., Hammarstrom,S., Holmes,K.V., Karlsson,A., Kuroki,M. et al 1999. Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell Res.* **252**:243-249.
9. Birkedal-Hansen,H. 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:728-735.
10. Bogoevska,V., Horst,A., Klampe,B., Lucka,L., Wagener,C., and Nollau,P. 2006. CEACAM1, an adhesion molecule of human granulocytes, is fucosylated by fucosyltransferase IX and interacts with DC-SIGN of dendritic cells via Lewis x residues. *Glycobiology* **16**:197-209.
11. Brandt,C.S., Baratin,M., Yi,E.C., Kennedy,J., Gao,Z., Fox,B., Haldeman,B., Ostrander,C.D., Kaifu,T., Chabannon,C. et al 2009. The B7 family member B7-H6 is

- a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* **206**:1495-1503.
12. Brummer,J., Ebrahimnejad,A., Flayeh,R., Schumacher,U., Loning,T., Bamberger,A.M., and Wagener,C. 2001. cis Interaction of the cell adhesion molecule CEACAM1 with integrin beta(3). *Am. J. Pathol.* **159**:537-546.
 13. Brummer,J., Neumaier,M., Gopfert,C., and Wagener,C. 1995. Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene* **11**:1649-1655.
 14. Burd,C.E., Liu,W., Huynh,M.V., Waqas,M.A., Gillahan,J.E., Clark,K.S., Fu,K., Martin,B.L., Jeck,W.R., Souroullas,G.P. et al 2014. Mutation-specific RAS oncogenicity explains NRAS codon 61 selection in melanoma. *Cancer Discov.* **4**:1418-1429.
 15. Burke,S., Lakshmikanth,T., Colucci,F., and Carbone,E. 2010. New views on natural killer cell-based immunotherapy for melanoma treatment. *Trends Immunol.* **31**:339-345.
 16. Busch,C., Hanssen,T.A., Wagener,C., and Obrink,B. 2002. Down-regulation of CEACAM1 in human prostate cancer: correlation with loss of cell polarity, increased proliferation rate, and Gleason grade 3 to 4 transition. *Hum. Pathol.* **33**:290-298.
 17. Casado,J.G., Pawelec,G., Morgado,S., Sanchez-Correa,B., Delgado,E., Gayoso,I., Duran,E., Solana,R., and Tarazona,R. 2009. Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.* **58**:1517-1526.
 18. Cavallaro,U., and Christofori,G. 2004. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**:118-132.
 19. Champsaur,M., and Lanier,L.L. 2010. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol. Rev.* **235**:267-285.
 20. Chapman,P.B., Hauschild,A., Robert,C., Haanen,J.B., Ascierto,P., Larkin,J., Dummer,R., Garbe,C., Testori,A., Maio,M. et al 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**:2507-2516.
 21. Chen,Z., Chen,L., Baker,K., Olszak,T., Zeissig,S., Huang,Y.H., Kuo,T.T., Mandelboim,O., Beauchemin,N., Lanier,L.L. et al 2011. CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. *J. Exp. Med.* **208**:2633-2640.
 22. Chitadze,G., Bhat,J., Lettau,M., Janssen,O., and Kabelitz,D. 2013. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand. J. Immunol.* **78**:120-129.

23. Cifone, M.A., and Fidler, I.J. 1980. Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine fibrosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**:1039-1043.
24. Colburn, N.H., Bruegge, W.F., Bates, J.R., Gray, R.H., Rossen, J.D., Kelsey, W.H., and Shimada, T. 1978. Correlation of anchorage-independent growth with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cells. *Cancer Res.* **38**:624-634.
25. Curran, S., and Murray, G.I. 1999. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.* **189**:300-308.
26. Danen, E.H., Jansen, K.F., van Kraats, A.A., Cornelissen, I.M., Ruiter, D.J., and van Muijen, G.N. 1995. Alpha v-integrins in human melanoma: gain of alpha v beta 3 and loss of alpha v beta 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice. *Int. J. Cancer* **61**:491-496.
27. Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W. et al 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**:949-954.
28. Davies, M.A. 2012. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J.* **18**:142-147.
29. Dery, K.J., Gaur, S., Gencheva, M., Yen, Y., Shively, J.E., and Gaur, R.K. 2011. Mechanistic control of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) splice isoforms by the heterogeneous nuclear ribonuclear proteins hnRNP L, hnRNP A1, and hnRNP M. *J. Biol. Chem.* **286**:16039-16051.
30. Deryugina, E.I., Ratnikov, B., Monosov, E., Postnova, T.I., DiScipio, R., Smith, J.W., and Strongin, A.Y. 2001. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **263**:209-223.
31. Duffy, M.J. 2001. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin. Chem.* **47**:624-630.
32. Ebrahimnejad, A., Streichert, T., Nollau, P., Horst, A.K., Wagener, C., Bamberger, A.M., and Brummer, J. 2004. CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells. *Am. J. Pathol.* **165**:1781-1787.
33. Esparza, J., Vilardell, C., Calvo, J., Juan, M., Vives, J., Urbano-Marquez, A., Yague, J., and Cid, M.C. 1999. Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. *Blood* **94**:2754-2766.
34. Faustino, N.A., and Cooper, T.A. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* **17**:419-437.
35. Faustino, N.A., and Cooper, T.A. 2005. Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Mol. Cell Biol.* **25**:879-887.

36. Fellenberg,F., Hartmann,T.B., Dummer,R., Usener,D., Schadendorf,D., and Eichmuller,S. 2004. GBP-5 splicing variants: New guanylate-binding proteins with tumor-associated expression and antigenicity. *J. Invest Dermatol.* **122**:1510-1517.
37. Fernandez-Messina,L., Ashiru,O., Boutet,P., Aguera-Gonzalez,S., Skepper,J.N., Reyburn,H.T., and Vales-Gomez,M. 2010. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J. Biol. Chem.* **285**:8543-8551.
38. Fidler,I.J. 1988. The biology of melanoma metastasis. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **14**:875-881.
39. Fiori,V., Magnani,M., and Cianfriglia,M. 2012. The expression and modulation of CEACAM1 and tumor cell transformation. *Ann. Ist. Super. Sanita* **48**:161-171.
40. Flaherty,K.T., Infante,J.R., Daud,A., Gonzalez,R., Kefford,R.F., Sosman,J., Hamid,O., Schuchter,L., Cebon,J., Ibrahim,N. et al 2012. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N. Engl. J. Med.* **367**:1694-1703.
41. Foletto,M.C., and Haas,S.E. 2014. Cutaneous melanoma: new advances in treatment. *An. Bras. Dermatol.* **89**:301-310.
42. Fournes,B., Farrah,J., Olson,M., Lamarche-Vane,N., and Beauchemin,N. 2003. Distinct Rho GTPase activities regulate epithelial cell localization of the adhesion molecule CEACAM1: involvement of the CEACAM1 transmembrane domain. *Mol. Cell Biol.* **23**:7291-7304.
43. Frisch,S.M., and Ruoslahti,E. 1997. Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:701-706.
44. Fuertes,M.B., Girart,M.V., Molinero,L.L., Domaica,C.I., Rossi,L.E., Barrio,M.M., Mordoh,J., Rabinovich,G.A., and Zwirner,N.W. 2008. Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* **180**:4606-4614.
45. Gambichler,T., Grothe,S., Rotterdam,S., Altmeyer,P., and Kreuter,A. 2009. Protein expression of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecules in benign and malignant melanocytic skin lesions. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**:782-787.
46. Garraway,L.A., Widlund,H.R., Rubin,M.A., Getz,G., Berger,A.J., Ramaswamy,S., Beroukhi,R., Milner,D.A., Granter,S.R., Du,J. et al 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**:117-122.
47. Gaur,S., Shively,J.E., Yen,Y., and Gaur,R.K. 2008. Altered splicing of CEACAM1 in breast cancer: identification of regulatory sequences that control splicing of CEACAM1 into long or short cytoplasmic domain isoforms. *Mol. Cancer* **7**:46.
48. Gold,P., and FREEDMAN,S.O. 1965. DEMONSTRATION OF TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN HUMAN COLONIC CARCINOMATA BY IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AND ABSORPTION TECHNIQUES. *J. Exp. Med.* **121**:439-462.

49. Gold,P., and FREEDMAN,S.O. 1965. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* **122**:467-481.
50. Gray-Owen,S.D., and Blumberg,R.S. 2006. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:433-446.
51. Gray-Schopfer,V., Wellbrock,C., and Marais,R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445**:851-857.
52. Groh,V., Wu,J., Yee,C., and Spies,T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**:734-738.
53. Hamada,H., Seidman,M., Howard,B.H., and Gorman,C.M. 1984. Enhanced gene expression by the poly(dT-dG).poly(dC-dA) sequence. *Mol. Cell Biol.* **4**:2622-2630.
54. Hazan,R.B., and Norton,L. 1998. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**:9078-9084.
55. Hecht,M.L., Rosental,B., Horlacher,T., HersHKovitz,O., De Paz,J.L., Noti,C., Schauer,S., Porgador,A., and Seeberger,P.H. 2009. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J. Proteome. Res.* **8**:712-720.
56. Heid,C.A., Stevens,J., Livak,K.J., and Williams,P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**:986-994.
57. Heinemann,A., Zhao,F., Pechlivanis,S., Eberle,J., Steinle,A., Diederichs,S., Schadendorf,D., and Paschen,A. 2012. Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res.* **72**:460-471.
58. Hodi,F.S., O'Day,S.J., McDermott,D.F., Weber,R.W., Sosman,J.A., Haanen,J.B., Gonzalez,R., Robert,C., Schadendorf,D., Hassel,J.C. et al 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **363**:711-723.
59. Hofmann,U.B., Houben,R., Brocker,E.B., and Becker,J.C. 2005. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie* **87**:307-314.
60. Hofmann,U.B., Westphal,J.R., Waas,E.T., Becker,J.C., Ruiter,D.J., and van Muijen,G.N. 2000. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J. Invest Dermatol.* **115**:625-632.
61. Hokari,M., Matsuda,Y., Wakai,T., Shirai,Y., Sato,M., Tsuchiya,A., Takamura,M., Yamagiwa,S., Suzuki,K., Ohkoshi,S. et al 2007. Tumor suppressor carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 potentiates the anchorage-independent growth of human hepatoma HepG2 cells. *Life Sci.* **81**:336-345.
62. Horn,S., Figl,A., Rachakonda,P.S., Fischer,C., Sucker,A., Gast,A., Kadel,S., Moll,I., Nagore,E., Hemminki,K. et al 2013. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* **339**:959-961.

-
63. Hosomi,S., Chen,Z., Baker,K., Chen,L., Huang,Y.H., Olszak,T., Zeissig,S., Wang,J.H., Mandelboim,O., Beauchemin,N. et al 2013. CEACAM1 on activated NK cells inhibits NKG2D-mediated cytolytic function and signaling. *Eur. J. Immunol.* **43**:2473-2483.
 64. Huang,J., Hardy,J.D., Sun,Y., and Shively,J.E. 1999. Essential role of biliary glycoprotein (CD66a) in morphogenesis of the human mammary epithelial cell line MCF10F. *J. Cell Sci.* **112** (Pt **23**):4193-4205.
 65. Huang,J., Simpson,J.F., Glackin,C., Riethorf,L., Wagener,C., and Shively,J.E. 1998. Expression of biliary glycoprotein (CD66a) in normal and malignant breast epithelial cells. *Anticancer Res.* **18**:3203-3212.
 66. Ieda,J., Yokoyama,S., Tamura,K., Takifuji,K., Hotta,T., Matsuda,K., Oku,Y., Nasu,T., Kiriyaama,S., Yamamoto,N. et al 2011. Re-expression of CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and migration of colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **129**:1351-1361.
 67. Johnson,J.P. 1999. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **18**:345-357.
 68. Kalialis,L.V., Drzewiecki,K.T., and Klyver,H. 2009. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res.* **19**:275-282.
 69. Kammerer,R., Hahn,S., Singer,B.B., Luo,J.S., and von,K.S. 1998. Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **28**:3664-3674.
 70. Kiriyaama,S., Yokoyama,S., Ueno,M., Hayami,S., Ieda,J., Yamamoto,N., Yamaguchi,S., Mitani,Y., Nakamura,Y., Tani,M. et al 2014. CEACAM1 Long Cytoplasmic Domain Isoform is Associated with Invasion and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*
 71. Kirshner,J., Chen,C.J., Liu,P., Huang,J., and Shively,J.E. 2003. CEACAM1-4S, a cell-cell adhesion molecule, mediates apoptosis and reverts mammary carcinoma cells to a normal morphogenic phenotype in a 3D culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:521-526.
 72. Klaile,E., Muller,M.M., Kannicht,C., Singer,B.B., and Lucka,L. 2005. CEACAM1 functionally interacts with filamin A and exerts a dual role in the regulation of cell migration. *J. Cell Sci.* **118**:5513-5524.
 73. Klaile,E., Vorontsova,O., Sigmundsson,K., Muller,M.M., Singer,B.B., Ofverstedt,L.G., Svensson,S., Skoglund,U., and Obrink,B. 2009. The CEACAM1 N-terminal Ig domain mediates cis- and trans-binding and is essential for allosteric rearrangements of CEACAM1 microclusters. *J. Cell Biol.* **187**:553-567.
 74. Koshikawa,N., Mizushima,H., Minegishi,T., Eguchi,F., Yotsumoto,F., Nabeshima,K., Miyamoto,S., Mekada,E., and Seiki,M. 2011. Proteolytic activation of heparin-binding EGF-like growth factor by membrane-type matrix metalloproteinase-1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Sci.* **102**:111-116.

-
75. Koshikawa,N., Mizushima,H., Minegishi,T., Iwamoto,R., Mekada,E., and Seiki,M. 2010. Membrane type 1-matrix metalloproteinase cleaves off the NH2-terminal portion of heparin-binding epidermal growth factor and converts it into a heparin-independent growth factor. *Cancer Res.* **70**:6093-6103.
 76. Kuespert,K., Pils,S., and Hauck,C.R. 2006. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:565-571.
 77. Kuphal,S., Bauer,R., and Bosserhoff,A.K. 2005. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **24**:195-222.
 78. Kuphal,S., and Bosserhoff,A.K. 2012. E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **524**:43-47.
 79. Kwong,L.N., and Davies,M.A. 2014. Targeted therapy for melanoma: rational combinatorial approaches. *Oncogene* **33**:1-9.
 80. Lanier,L.L. 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**:495-502.
 81. Lee,S.B., Schramme,A., Doberstein,K., Dummer,R., Abdel-Bakky,M.S., Keller,S., Altevogt,P., Oh,S.T., Reichrath,J., Oxmann,D. et al 2010. ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *J. Invest Dermatol.* **130**:763-773.
 82. Liu,G., Atteridge,C.L., Wang,X., Lundgren,A.D., and Wu,J.D. 2010. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J. Immunol.* **184**:3346-3350.
 83. Livak,K.J., and Schmittgen,T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-408.
 84. Lovly,C.M., Dahlman,K.B., Fohn,L.E., Su,Z., Dias-Santagata,D., Hicks,D.J., Hucks,D., Berry,E., Terry,C., Duke,M. et al 2012. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS. One.* **7**:e35309.
 85. Luo,W., Tapolsky,M., Earley,K., Wood,C.G., Wilson,D.R., Logothetis,C.J., and Lin,S.H. 1999. Tumor-suppressive activity of CD66a in prostate cancer. *Cancer Gene Ther.* **6**:313-321.
 86. Markel,G., Achdout,H., Katz,G., Ling,K.L., Salio,M., Gruda,R., Gazit,R., Mizrahi,S., Hanna,J., Gonen-Gross,T. et al 2004. Biological function of the soluble CEACAM1 protein and implications in TAP2-deficient patients. *Eur. J. Immunol.* **34**:2138-2148.
 87. Markel,G., Gruda,R., Achdout,H., Katz,G., Nechama,M., Blumberg,R.S., Kammerer,R., Zimmermann,W., and Mandelboim,O. 2004. The critical role of residues 43R and 44Q of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecules-1 in the protection from killing by human NK cells. *J. Immunol.* **173**:3732-3739.

-
88. Markel,G., Lieberman,N., Katz,G., Arnon,T.I., Lotem,M., Drize,O., Blumberg,R.S., Bar-Haim,E., Mader,R., Eisenbach,L. et al 2002. CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J. Immunol.* **168**:2803-2810.
89. Markel,G., Lieberman,N., Katz,G., Arnon,T.I., Lotem,M., Drize,O., Blumberg,R.S., Bar-Haim,E., Mader,R., Eisenbach,L. et al 2002. CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J. Immunol.* **168**:2803-2810.
90. Markel,G., Mussaffi,H., Ling,K.L., Salio,M., Gadola,S., Steuer,G., Blau,H., Achdout,H., de,M.M., Gonen-Gross,T. et al 2004. The mechanisms controlling NK cell autoreactivity in TAP2-deficient patients. *Blood* **103**:1770-1778.
91. Markel,G., Ortenberg,R., Seidman,R., Sapoznik,S., Koren-Morag,N., Besser,M.J., Bar,J., Shapira,R., Kubi,A., Nardini,G. et al 2010. Systemic dysregulation of CEACAM1 in melanoma patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **59**:215-230.
92. Markel,G., Seidman,R., Cohen,Y., Besser,M.J., Sinai,T.C., Treves,A.J., Orenstein,A., Berger,R., and Schachter,J. 2009. Dynamic expression of protective CEACAM1 on melanoma cells during specific immune attack. *Immunology* **126**:186-200.
93. Markel,G., Seidman,R., Stern,N., Cohen-Sinai,T., Izhaki,O., Katz,G., Besser,M., Treves,A.J., Blumberg,R.S., Loewenthal,R. et al 2006. Inhibition of human tumor-infiltrating lymphocyte effector functions by the homophilic carcinoembryonic cell adhesion molecule 1 interactions. *J. Immunol.* **177**:6062-6071.
94. Markel,G., Wolf,D., Hanna,J., Gazit,R., Goldman-Wohl,D., Lavy,Y., Yagel,S., and Mandelboim,O. 2002. Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J. Clin. Invest* **110**:943-953.
95. Mattox,D.E., and Von Hoff,D.D. 1980. In vitro stem cell assay in head and neck squamous carcinoma. *Am. J. Surg.* **140**:527-530.
96. McCuaig,K., Turbide,C., and Beauchemin,N. 1992. mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as an adhesion molecule. *Cell Growth Differ.* **3**:165-174.
97. Mirjagic Martinovic,K.M., Babovic,N.L., Dzodic,R.R., Jurisic,V.B., Tanic,N.T., and Konjevic,G.M. 2014. Decreased expression of NKG2D, NKp46, DNAM-1 receptors, and intracellular perforin and STAT-1 effector molecules in NK cells and their dim and bright subsets in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res.* **24**:295-304.
98. Morgado,S., Sanchez-Correa,B., Casado,J.G., Duran,E., Gayoso,I., Labella,F., Solana,R., and Tarazona,R. 2011. NK cell recognition and killing of melanoma cells is controlled by multiple activating receptor-ligand interactions. *J. Innate. Immun.* **3**:365-373.
99. Mori,S., Chang,J.T., Andrechek,E.R., Matsumura,N., Baba,T., Yao,G., Kim,J.W., Gatza,M., Murphy,S., and Nevins,J.R. 2009. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene* **28**:2796-2805.

100. Muller,M.M., Klaile,E., Vorontsova,O., Singer,B.B., and Obrink,B. 2009. Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src. *J. Cell Biol.* **187**:569-581.
101. Muller,M.M., Singer,B.B., Klaile,E., Obrink,B., and Lucka,L. 2005. Transmembrane CEACAM1 affects integrin-dependent signaling and regulates extracellular matrix protein-specific morphology and migration of endothelial cells. *Blood* **105**:3925-3934.
102. Mullis,K.B., and Faloona,F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
103. Nagaishi,T., Pao,L., Lin,S.H., Iijima,H., Kaser,A., Qiao,S.W., Chen,Z., Glickman,J., Najjar,S.M., Nakajima,A. et al 2006. SHP1 phosphatase-dependent T cell inhibition by CEACAM1 adhesion molecule isoforms. *Immunity.* **25**:769-781.
104. Natali,P.G., Nicotra,M.R., Cavaliere,R., Giannarelli,D., and Bigotti,A. 1991. Tumor progression in human malignant melanoma is associated with changes in alpha 6/beta 1 laminin receptor. *Int. J. Cancer* **49**:168-172.
105. Nausch,N., and Cerwenka,A. 2008. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* **27**:5944-5958.
106. Nedellec,P., Dveksler,G.S., Daniels,E., Turbide,C., Chow,B., Basile,A.A., Holmes,K.V., and Beauchemin,N. 1994. Bgp2, a new member of the carcinoembryonic antigen-related gene family, encodes an alternative receptor for mouse hepatitis viruses. *J. Virol.* **68**:4525-4537.
107. Neumaier,M., Paululat,S., Chan,A., Matthaes,P., and Wagener,C. 1993. Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:10744-10748.
108. Nittka,S., Gunther,J., Ebisch,C., Erbersdobler,A., and Neumaier,M. 2004. The human tumor suppressor CEACAM1 modulates apoptosis and is implicated in early colorectal tumorigenesis. *Oncogene* **23**:9306-9313.
109. Nomura,Y., Tashiro,H., and Hisamatsu,K. 1989. In vitro clonogenic growth and metastatic potential of human operable breast cancer. *Cancer Res.* **49**:5288-5293.
110. Oblander,S.A., Zhou,Z., Galvez,B.G., Starcher,B., Shannon,J.M., Durbeej,M., Arroyo,A.G., Tryggvason,K., and Apte,S.S. 2005. Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev. Biol.* **277**:255-269.
111. Obrink,B. 1997. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:616-626.
112. Ortenberg,R., Galore-Haskel,G., Greenberg,I., Zamlin,B., Sapoznik,S., Greenberg,E., Barshack,I., Avivi,C., Feiler,Y., Zan-Bar,I. et al 2014. CEACAM1 promotes melanoma cell growth through Sox-2. *Neoplasia.* **16**:451-460.
113. Ortenberg,R., Sapir,Y., Raz,L., Hershkovitz,L., Ben,A.A., Sapoznik,S., Barshack,I., Avivi,C., Berkun,Y., Besser,M.J. et al 2012. Novel immunotherapy for malignant

- melanoma with a monoclonal antibody that blocks CEACAM1 homophilic interactions. *Mol. Cancer Ther.* **11**:1300-1310.
114. Paschen,A., Sucker,A., Hill,B., Moll,I., Zapatka,M., Nguyen,X.D., Sim,G.C., Gutmann,I., Hassel,J., Becker,J.C. et al 2009. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin. Cancer Res.* **15**:5208-5215.
 115. Pegram,H.J., Andrews,D.M., Smyth,M.J., Darcy,P.K., and Kershaw,M.H. 2011. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol. Cell Biol.* **89**:216-224.
 116. Pende,D., Rivera,P., Marcenaro,S., Chang,C.C., Biassoni,R., Conte,R., Kubin,M., Cosman,D., Ferrone,S., Moretta,L. et al 2002. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* **62**:6178-6186.
 117. Pessino,A., Sivori,S., Bottino,C., Malaspina,A., Morelli,L., Moretta,L., Biassoni,R., and Moretta,A. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* **188**:953-960.
 118. Piris,A., Mihm,M.C., Jr., and Duncan,L.M. 2011. AJCC melanoma staging update: impact on dermatopathology practice and patient management. *J. Cutan. Pathol.* **38**:394-400.
 119. Price,J.E. 1986. Clonogenicity and experimental metastatic potential of spontaneous mouse mammary neoplasms. *J. Natl. Cancer Inst.* **77**:529-535.
 120. Raulet,D.H. 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:781-790.
 121. Raulet,D.H., Gasser,S., Gowen,B.G., Deng,W., and Jung,H. 2013. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **31**:413-441.
 122. Sadekova,S., Lamarche-Vane,N., Li,X., and Beauchemin,N. 2000. The CEACAM1-L glycoprotein associates with the actin cytoskeleton and localizes to cell-cell contact through activation of Rho-like GTPases. *Mol. Biol. Cell* **11**:65-77.
 123. Salih,H.R., Holdenrieder,S., and Steinle,A. 2008. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front Biosci.* **13**:3448-3456.
 124. Salih,H.R., Rammensee,H.G., and Steinle,A. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* **169**:4098-4102.
 125. Sapoznik,S., Ortenberg,R., Schachter,J., and Markel,G. 2012. CEACAM1 in malignant melanoma: a diagnostic and therapeutic target. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**:3-10.
 126. Sato,H., Takino,T., and Miyamori,H. 2005. Roles of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. *Cancer Sci.* **96**:212-217.

127. Sauter,E.R., Yeo,U.C., von,S.A., Zhu,W., Litwin,S., Tichansky,D.S., Pistritto,G., Nesbit,M., Pinkel,D., Herlyn,M. et al 2002. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res.* **62**:3200-3206.
128. Sboner,A., Eccher,C., Blanzieri,E., Bauer,P., Cristofolini,M., Zumiani,G., and Forti,S. 2003. A multiple classifier system for early melanoma diagnosis. *Artif. Intell. Med.* **27**:29-44.
129. Schadendorf,D., and Hauschild,A. 2014. Melanoma in 2013: Melanoma-the run of success continues. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*
130. Scheffrahn,I., Singer,B.B., Sigmundsson,K., Lucka,L., and Obrink,B. 2005. Control of density-dependent, cell state-specific signal transduction by the cell adhesion molecule CEACAM1, and its influence on cell cycle regulation. *Exp. Cell Res.* **307**:427-435.
131. Schoenborn,J.R., and Wilson,C.B. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* **96**:41-101.
132. Schumann,D., Chen,C.J., Kaplan,B., and Shively,J.E. 2001. Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton proteins actin and tropomyosin. *J. Biol. Chem.* **276**:47421-47433.
133. Sharpless,E., and Chin,L. 2003. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* **22**:3092-3098.
134. Shiau,M.Y., Fan,L.C., Yang,S.C., Tsao,C.H., Lee,H., Cheng,Y.W., Lai,L.C., and Chang,Y.H. 2013. Human papillomavirus up-regulates MMP-2 and MMP-9 expression and activity by inducing interleukin-8 in lung adenocarcinomas. *PLoS. One.* **8**:e54423.
135. Shin,S.I., Freedman,V.H., Risser,R., and Pollack,R. 1975. Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **72**:4435-4439.
136. Sienel,W., Dango,S., Woelfle,U., Morresi-Hauf,A., Wagener,C., Brummer,J., Mutschler,W., Passlick,B., and Pantel,K. 2003. Elevated expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes progression of non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**:2260-2266.
137. Singer,B.B., Klaile,E., Scheffrahn,I., Muller,M.M., Kammerer,R., Reutter,W., Obrink,B., and Lucka,L. 2005. CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur. J. Immunol.* **35**:1949-1959.
138. Singer,B.B., Opp,L., Heinrich,A., Schreiber,F., Binding-Liermann,R., Berrocal-Almanza,L.C., Heyl,K.A., Muller,M.M., Weimann,A., Zweigner,J. et al 2014. Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. *PLoS. One.* **9**:e94106.
139. Singer,B.B., Scheffrahn,I., and Obrink,B. 2000. The tumor growth-inhibiting cell adhesion molecule CEACAM1 (C-CAM) is differently expressed in proliferating and quiescent epithelial cells and regulates cell proliferation. *Cancer Res.* **60**:1236-1244.

140. Sivori,S., Pende,D., Bottino,C., Marcenaro,E., Pessino,A., Biassoni,R., Moretta,L., and Moretta,A. 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur. J. Immunol.* **29**:1656-1666.
141. Soengas,M.S., Gerald,W.L., Cordon-Cardo,C., Lazebnik,Y., and Lowe,S.W. 2006. Apaf-1 expression in malignant melanoma. *Cell Death. Differ.* **13**:352-353.
142. Srivastava,R.M., Savithri,B., and Khar,A. 2003. Activating and inhibitory receptors and their role in natural killer cell function. *Indian J. Biochem. Biophys.* **40**:291-299.
143. Stahl,J.M., Sharma,A., Cheung,M., Zimmerman,M., Cheng,J.Q., Bosenberg,M.W., Kester,M., Sandirasegarane,L., and Robertson,G.P. 2004. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* **64**:7002-7010.
144. Stamenkovic,I. 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **10**:415-433.
145. Stern,N., Markel,G., Arnon,T.I., Gruda,R., Wong,H., Gray-Owen,S.D., and Mandelboim,O. 2005. Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1. *J. Immunol.* **174**:6692-6701.
146. Stern-Ginossar,N., Nedvetzki,S., Markel,G., Gazit,R., Betser-Cohen,G., Achdout,H., Aker,M., Blumberg,R.S., Davis,D.M., Appelmelk,B. et al 2007. Intercellular transfer of carcinoembryonic antigen from tumor cells to NK cells. *J. Immunol.* **179**:4424-4434.
147. Straume,O., and Akslen,L.A. 1997. Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* **74**:535-539.
148. Sundberg,U., and Obrink,B. 2002. CEACAM1 isoforms with different cytoplasmic domains show different localization, organization and adhesive properties in polarized epithelial cells. *J. Cell Sci.* **115**:1273-1284.
149. Sutherland,C.M., Mather,F.J., Carter,R.D., Cerise,E.J., and Krementz,E.T. 1983. Breast cancer as analyzed by the human tumor stem cell assay. *Surgery* **94**:370-375.
150. Terme,M., Ullrich,E., Delahaye,N.F., Chaput,N., and Zitvogel,L. 2008. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat. Immunol.* **9**:486-494.
151. Thies,A., Berlin,A., Brunner,G., Schulze,H.J., Moll,I., Pfuller,U., Wagener,C., Schachner,M., Altevogt,P., and Schumacher,U. 2007. Glycoconjugate profiling of primary melanoma and its sentinel node and distant metastases: implications for diagnosis and pathophysiology of metastases. *Cancer Lett.* **248**:68-80.
152. Thies,A., Moll,I., Berger,J., Wagener,C., Brummer,J., Schulze,H.J., Brunner,G., and Schumacher,U. 2002. CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **20**:2530-2536.

153. Thomson,D.M., Krupey,J., FREEDMAN,S.O., and Gold,P. 1969. The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **64**:161-167.
154. Tsao,H., Goel,V., Wu,H., Yang,G., and Haluska,F.G. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest Dermatol.* **122**:337-341.
155. van Gisbergen,K.P., Ludwig,I.S., Geijtenbeek,T.B., and van,K.Y. 2005. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.* **579**:6159-6168.
156. Vetter,C.S., Groh,V., thor,S.P., Spies,T., Brocker,E.B., and Becker,J.C. 2002. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J. Invest Dermatol.* **118**:600-605.
157. Wagle,N., Emery,C., Berger,M.F., Davis,M.J., Sawyer,A., Pochanard,P., Kehoe,S.M., Johannessen,C.M., Macconail,L.E., Hahn,W.C. et al 2011. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J. Clin. Oncol.* **29**:3085-3096.
158. Waldhauer,I., and Steinle,A. 2006. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res.* **66**:2520-2526.
159. Wang,A.X., and Qi,X.Y. 2013. Targeting RAS/RAF/MEK/ERK signaling in metastatic melanoma. *IUBMB. Life* **65**:748-758.
160. Watt,S.M., Teixeira,A.M., Zhou,G.Q., Doyonnas,R., Zhang,Y., Grunert,F., Blumberg,R.S., Kuroki,M., Skubitz,K.M., and Bates,P.A. 2001. Homophilic adhesion of human CEACAM1 involves N-terminal domain interactions: structural analysis of the binding site. *Blood* **98**:1469-1479.
161. Wehner,R., Dietze,K., Bachmann,M., and Schmitz,M. 2011. The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J. Innate. Immun.* **3**:258-263.
162. Xie,S., Luca,M., Huang,S., Gutman,M., Reich,R., Johnson,J.P., and Bar-Eli,M. 1997. Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **57**:2295-2303.
163. Yu,Q., Chow,E.M., Wong,H., Gu,J., Mandelboim,O., Gray-Owen,S.D., and Ostrowski,M.A. 2006. CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **281**:39179-39193.

10. Danksagung

Im Folgenden möchte ich den Menschen danken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen habe.

Mein großer Dank geht an Prof. Dr. Dirk Schadendorf, dafür dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung durchzuführen. Zudem möchte ich mich für die stete Unterstützung bedanken. Nicht zuletzt durch die hervorragende Ausstattung des Instituts wurden die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente erst möglich gemacht.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. rer. nat. Iris Helfrich, die mir in ihrer Arbeitsgruppe die Möglichkeit gab, selbstständig meinen Ideen nachzugehen und neue Techniken zu erlernen. Weiterhin danke ich ihr für die Betreuung während der Zeit meiner Doktorarbeit, die zahlreichen Gespräche verhelfen mir zu neuen Sichtweisen.

PD. Dr. Bernhard Bonaventura Singer war nicht nur ein großartiger Kooperationspartner mit zahlreichen neuen Ideen sondern wurde während der letzten Jahre zu einem guten Freund. Danke Bernhard, für die vielen motivierenden und witzigen Gespräche, die mir geholfen haben die Dinge aus einem anderen Blickwinkel zu sehen. Vielen Dank auch für die Einführung am FACS und dem Korrekturlesen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich in verschiedenen Abschnitten meiner Arbeit im Labor unterstützt haben, vielen Dank Nadine Hochhard, Christiane Breuer, Mohamed Benchellal, Mara Novak, Mark Kretschmer, Raya Rausch und den zahlreichen Praktikanten, Bachelor- und Masterstudenten. Ich möchte mich auch bei Elena Nilewski für die Bereitstellung der CEACAM1 Plasmide bedanken. Birgit Maranca-Hüwel und Bärbel Gobs-Hevelke danke ich dafür, dass sie mich stets mit CEACAM1 Antikörpern versorgt haben, mich am FACS unterstützten und mir das Protokoll für die Phalloidin-Färbung zur Verfügung stellten.

In diesem Sinne möchte ich auch dem gesamten Labor-HAUT danken, alle Mitarbeiter der Labore Paschen, Sucker und Rösch haben mir nicht nur mit Materialien ausgeholfen sondern standen mir auch sonst stets mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank auch für die Gesellschaft während der Mittags- und Kaffeepausen sowie den jährlichen Weihnachtsfeiern.

Außerdem möchte ich mich recht herzlich bei den Kollegen des MFZs bedanken, hierbei vor allem bei Dr. Sven Lindner und Simon Schäfers für die vielen lustigen Abende im Labor

sowie Mareike Horstmann, Dr. Kristina Althoff, Andrea Odersky, Lysann Riedel, Gina-Eva Görtz, Dr. Theresa Thor, und dem ganzen Endo-Labor. Vielen Dank für die lustige Zeit während den Kaffeepausen und den diversen Partys, welche einen guten Ausgleich zum harten Laboralltag darstellten. Ein großer Dank geht auch an Dr. Anthony Squire und Alexandra Breuer aus der IMCES, die mich bei meinen mikroskopischen Experimenten unterstützten und stets für alle Probleme eine Lösung wussten.

Ich möchte mich außerdem bei allen Doktoranden und Post-Docs des monatlichen Ph.D. Stammtisches bedanken, die fachlichen Diskussionen gepaart mit gegenseitigem Motivieren haben mir stets neuen Antrieb gegeben. Hierbei danke ich ganz besonders Dr. Ivo Bendix, der stets einen guten Spruch bzw. eine super Idee auf Lager hatte.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an meine Familie für den Rückhalt während der vergangenen Jahre. Vielen Dank für euer Verständnis, wenn ich mal wieder wochenlang vergessen habe zu melden. Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, sie haben immer an mich geglaubt und mich stets unterstützt. Vielen Dank, dass ihr immer zu mir gestanden habt und weiterhin steht!

Mein größter Dank gilt meiner Freundin und Kooperationspartnerin Dr. Anja Heinemann. Zum Einem, dass du mir gezeigt hast wie man NK Zellen isoliert und Zytotoxizitäts-Experimente durchführt, ohne dies wäre ein wichtiger Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank auch für das mehrfache Korrekturlesen dieser Arbeit. Zum Anderem möchte ich dir ganz besonders für deinen Rückhalt, deine Unterstützung, deiner endlosen Geduld, deinem Verständnis und deiner Liebe danken. Danke, dass es dich gibt!

11. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der im Menschen exprimierten Mitglieder der CEACAM-Familie	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung aller humanen CEACAM1 Isoformen.....	17
Abbildung 3: NK-Zell Aktivierung ist abhängig von der Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen.....	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Primerlokalisation für die semi-quantitative RT-PCR zur Analyse der CEACAM1 Isoformen-Expression	62
Abbildung 5: Die relative Expression der CEACAM1-3 Isoformen steigt mit der Passagenanzahl.....	64
Abbildung 6: CEACAM1-3 Expression korreliert mit dem klinischen Stadium, wobei eine erhöhte CEACAM1-3S Expression mit einer besseren Prognose korreliert.....	68
Abbildung 7: Die Expression von CEACAM1-3S im malignen Melanom korreliert mit einem verlängerten Gesamtüberleben der Patienten	69
Abbildung 8: CEACAM1-Transfektanten der Zelllinie Ma-Mel-86a zeigen distinkte Expression der einzelnen Isoformen.	71
Abbildung 9: CEACAM1 Isoformen weisen unterschiedliche zelluläre Lokalisationen in Melanomzellen auf.....	73
Abbildung 10: CEACAM1 Isoformen beeinflussen unterschiedlich die Zellmotilität von Melanomzellen.....	75
Abbildung 11: CEACAM1 Isoformen haben keinen Einfluss auf die Proliferation von Melanomzellen.....	76
Abbildung 12: CEACAM1-4L erhöht das Potential von Melanomzellen ohne Kontakt zu einer Matrix zu wachsen	77
Abbildung 13: Ausschließlich CEACAM1-3S erhöht die Oberflächenexpression von NK-Zell spezifischen Liganden auf Melanomzellen	80
Abbildung 14: CEACAM1-4L erhöht die MMP-vermittelte Freisetzung von NKG2DL	82
Abbildung 15: CEACAM1-3S erhöht die Immunogenität von Melanomzellen.....	85
Abbildung 16: Blockade von DNAM-1 und NKG2D verringert die Immunogenitätssteigernde Wirkung von CEACAM1-3S, während die CEACAM1 Blockade die spezifische Lyse erhöht.	87

12. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufig auftretende, genetische Veränderungen im malignen Melanom.....	10
Tabelle 2: Klassifizierung von Melanompatienten entsprechend den AJCC Richtlinien.....	11
Tabelle 3: NK-Zellrezeptoren	23
Tabelle 4: Expression der CEACAM1 Spleißvarianten in Melanomzelllinien	63
Tabelle 5: Expression der CEACAM1 Isoformen in Biopsien von Melanompatienten und korrespondierende Patientencharakteristika.....	65
Tabelle 6: Quantitative Expressionsanalysen der CEACAM1 Isoformenexpression in humanen Melanombiopsien	67

13. Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Folgende Publikationen wurden während der Zeit dieser Doktorarbeit angefertigt bzw. vorbereitet:

Iris Helfrich, **Nico Ullrich**, Paola Zigrino, Dirk Schadendorf, „Primary tumor versus metastasis: new experimental models for studies on cancer cell homing and metastasis in melanoma“, *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Mar 27(2):309-16

Nico Ullrich, Anja Heinemann, Elena Nilewski, Inka Scheffrahn, Joachim Klode, André Scherag, Dirk Schadendorf, Bernhard B. Singer, Iris Helfrich, „CEACAM1-3S drives melanoma cells into NK cell-mediated cytotoxicity and enhances patient survival“, *Cancer Res.*, akzeptiert

Nico Ullrich, Stefanie Löffek, Christopher Menne, Dirk Schadendorf, Bernhard B. Singer, Iris Helfrich, „CEACAM1-4L promotes anchorage-independent growth in melanoma“, eingereicht

Nico Ullrich, Steffanie Löffek, Colion R. Goding, Irwin Davidson, Bernhard B. Singer, Dirk Schadendorf, Iris Helfrich, „The microphthalmia-associated transcription factor MITF directly regulates the expression of CEACAM1 in malignant melanoma“, In Vorbereitung

Janine D. Dreesen, Elena Nilewski, **Nico Ullrich**, Lisa Majer, Sara Breitzkreutz, Andre Görgens, Iris Helfrich, Bernd Giebel, Tom Moore, Harrison M. Muturi, Gunther Wennemuth and Bernhard B. Singer, „Isolation method for extracellular microvesicle in their native form“, In Vorbereitung

Nico Ullrich, Marc Kretschmer, Christian Stockmann, Christiane Breuer, Nadine Hochhard, Iris Moll, Antje Sucker, Nina Parohl, Dirk Schadendorf, Iris Helfrich, „Macrophage-mediated Lymph Node Lymphangiogenesis as a Hallmark of Lymphatic Metastasis for Melanoma with Unknown Primary“, In Vorbereitung

Kongressbeiträge

Ullrich N., Breuer C., Nilewski E., Schadendorf D., Singer B.B., Helfrich I. Functional analysis of CEACAM1 isoforms in malignant melanoma. Poster, Wissenschaftstag der Universität Duisburg-Essen, 23.11.2012, Essen

Ullrich N., Breuer C., Nilewski E., Schadendorf D., Singer B.B., Helfrich I. The N-terminal domain of CEACAM1 as potential target for immunotherapy in malignant melanoma. Poster, Symposium “Trends in Melanoma Research”, 4.-5. Juni 2013, Bonn

Ullrich N., Singer B.B., Breuer C., Nilewski E., Schadendorf D., Helfrich I. The N-terminal Domain of CEACAM1 as a Potential Target for Antibody-based Immunotherapy in Malignant Melanoma” Vortrag, “23rd Annual International CEA Symposium”, 15.-18.08.2013, Toledo, USA

Ullrich N., Heinemann A., Nilewski E., Scheffrahn I., Klode J., Scherag A., Schadendorf D., Singer B.B., Helfrich I. CEACAM1 isoforms differentially influence malignant melanoma progression: CEACAM1-3S represents a novel prognostic biomarker” Poster, 41st Annual ADF Meeting, 13. -15.11.2013, Köln

Ullrich N., Heinemann A., Nilewski E., Scheffrahn I., Klode J., Scherag A., Schadendorf D., Singer B.B., Helfrich I. CEACAM1 isoforms differentially influence malignant melanoma progression: CEACAM1-3S represents a novel prognostic biomarker” Poster (Posterpreis), Wissenschaftstag der Universität Duisburg-Essen,, 22.11.2013, Essen

14. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

15. Eidesstattliche Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Die klinische und biologische Relevanz der CEACAM1 Spleißvarianten im malignen Melanom“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nico Ullrich befürworte.

Essen, den _____

PD. Dr. rer. nat. Iris Helfrich

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Nico Ullrich

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Nico Ullrich